



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

IARA GONÇALVES DE AQUINO

**EFEITOS DO INIBIDOR DA ÁCIDO GRAXO SINTASE TVB-3166
SOBRE LINHAGENS CELULARES DERIVADAS DE CARCINOMA
ESPINOCELULAR ORAL**

Piracicaba

2019

IARA GONÇALVES DE AQUINO

**EFEITOS DO INIBIDOR DA ÁCIDO GRAXO SINTASE TVB-3166
SOBRE LINHAGENS CELULARES DERIVADAS DE CARCINOMA
ESPINOCELULAR ORAL**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra em Estomatopatologia, na Área de Estomatologia.

Orientador: Prof. Dr. Edgard Graner

Este exemplar corresponde à versão final da dissertação defendida pela aluna Iara Gonçalves de Aquino e orientada pelo Prof.Dr. Edgard Graner.

Piracicaba

2019

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CAPES

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba
Marilene Girello - CRB 8/6159

Aq56e Aquino, Iara Gonçalves de, 1993-
Efeitos do inibidor da ácido graxo sintase TVB-3166 sobre linhagens celulares derivadas de carcinoma espinocelular oral / Iara Gonçalves de Aquino. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2019.

Orientador: Edgard Graner.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Carcinoma de células escamosas. 2. Ácido graxo sintases. I. Graner, Edgard, 1968-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Effects of fatty acid synthase inhibitor TVB-3166 on cells lines derived from oral squamous cell carcinoma

Palavras-chave em inglês:

Oral squamous cell carcinoma
Fatty acid synthase

Área de concentração: Estomatologia

Titulação: Mestra em Estomatopatologia

Banca examinadora:

Edgard Graner [Orientador]
Michelle Agostini
Débora Campanella Bastos

Data de defesa: 27-02-2019

Programa de Pós-Graduação: Estomatopatologia

Identificação e informações acadêmicas e profissionais do (a) aluno (a):

- **ORCID:** 0000-0002-4795-7884

- **Currículo Lattes:** <http://lattes.cnpq.br/9395234462749605>



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em 27 de Fevereiro de 2019, considerou a candidata IARA GONÇALVES DE AQUINO aprovada.

PROF. DR. EDGARD GRANER

PROF^a. DR^a. MICHELLE AGOSTINI

PROF^a. DR^a. DÉBORA CAMPANELLA BASTOS

A Ata da defesa, assinada pelos membros da Comissão Examinadora, consta no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

DEDICATÓRIA

À minha mãe:

Lutadora incansável. Exemplo de honestidade, dedicação e amor incondicional. Por ter acompanhado incansavelmente meus passos e nunca ter medido esforços para a concretização dos meus sonhos. Pelo carinho e colo que nunca faltaram e por carregar, todos os dias, meu coração.

Com todo meu amor, hoje e sempre.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, na pessoa de seu diretor, Prof. Dr. Francisco Haiter Neto;

À Coordenadoria de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba na pessoa da Profa. Dra. **Karina Gonzales Silveiro Ruiz** e ao Programa de Pós-Graduação em Estomatopatologia em nome do coordenador Prof. Dr. **Márcio Ajudarte Lopes**;

Ao meu orientador, Prof. Dr. **Edgard Graner** agradeço pela confiança, incentivo e compartilhamento de conhecimentos ao longo deste período. Expresso minha gratidão, admiração e respeito.

Aos Profs. Drs. **Jacks Jorge Júnior, Oslei Paes de Almeida, Pablo Augustin Vargas, Márcio Ajudarte Lopes, Alan Roger dos Santos Silva e Ricardo Della Coletta** professores das áreas de Patologia e Semiologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba por todo suporte, dedicação e valiosos ensinamentos.

Aos Profs. Drs. **Michelle Agostini, Mário José Romãnach e Bruno Augusto Benevenuto de Andrade** da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), pelos exemplos de mestres, por terem me guiado nas fases iniciais da minha formação acadêmica e, principalmente, pelo empenho que se dedicam as atividades profissionais.

À **Bruna Mendonça dos Santos** pela admirável dedicação e paciência durante meu projeto de iniciação científica. Agradeço por todos os ensinamentos no laboratório e por sido fundamental na minha escolha por este campo integrante da Biologia Molecular.

À minha avó **Eleonay**, que deixou saudades, amor, ensinamentos e coragem. À minha tia **Mônica**, por ter me orientado sobre as razões legítimas de lutar e super os obstáculos da vida,

dando-me apoio moral e intelectual em toda minha trajetória. Ao **Giovanni** e **Julia** por me lembrarem constantemente que a vida não precisa ser complicada. Aos meus familiares por terem acreditado no meu potencial. Sem vocês esta conquista não teria sido possível.

Aos meus amigos do coração **Victor, Vinicius, Guilherme, Hugo, Luana, Thadeu** e **Mylla** pela amizade sincera e incontáveis momentos de alegria que vivemos ao longo de tantos anos. Por todos os incentivos e, mesmo com a distância, estarem sempre presentes.

Ao **Luan César**, que sempre esteve ao meu lado, que nunca se cansou de ouvir meus dramas sem sentido, que me incentivou, apoiou e que sempre teve uma palavra amiga para me dizer mesmo quando não sabia bem o que dizer. Agradeço pela amizade que construímos, por ter me aturado nos meus melhores e piores dias (e não foram poucos). Continuarei reclamando das músicas que você ouve, mas mesmo assim, cantarei todas elas com você.

À **Raisa Sales** pela amizade e conselhos sinceros, por buscar sempre o melhor nas pessoas e, provavelmente, mais do que deveria. Ao **João Scarini**, que vive todo dia um dilema diferente, e me encanta com sua inocência e incapacidade de guardar rancor. Ao **Bruno Augusto**, pelos exemplos de dedicação, esforço, ensinamentos diários e amizade. À **Natália Palmier**, que me acolheu desde o primeiro dia, e me proporcionou tantos momentos de risadas sinceras. Ao **Rodrigo Soares** por ser esta pessoa incrivelmente autêntica. À **Ana Letícia Mello** por sua alegria contagiante. Ao **Rocharles Fontenele** pelo carinho e parceria de todas as horas. Vocês tornaram esta conquista mais leve e possível.

Aos amigos do laboratório **Renato, Isadora, Ana Camila**, pela troca de conhecimentos, colaborações e momentos de descontração. Especialmente à **Florence** por todo carinho, gentileza, além da contribuição acadêmica, compartilhada nas longas conversas sérias, e por todos os conselhos e desabafos. À **Débora Bastos** por todo apoio e contribuições durante esta trajetória acadêmica. Pela sua empatia e, principalmente, por ser um exemplo de ética profissional.

Aos demais amigos e colegas da pós-graduação **Rachel, Jéssica, Isabel, Patrícia, Maurício, Leonardo, Pedro, Marisol, Diego, Carolina Carneiro**, pelo companheirismo e diversão. Sempre me lembrarei dos nossos melhores momentos com muito carinho e saudades.

RESUMO

O carcinoma espinocelular (CEC) representa mais de 90% das neoplasias malignas que acometem a cavidade oral, estando associado a índices consideráveis de recidivas precoces, metástases para os linfonodos cervicais, além de baixas taxas de sobrevida. A cirurgia é a principal modalidade terapêutica para o CEC oral, no entanto, quando em estágios avançados, os pacientes são incluídos em protocolos radioquimioterápicos. Vários estudos têm consistentemente mostrado que a enzima metabólica ácido graxo sintase (FASN), responsável pela biossíntese endógena de ácidos graxos de cadeia longa, apresenta expressão aumentada em diversas neoplasias malignas, incluindo no CEC oral, no qual está associada a um pior prognóstico. Por esta razão, a FASN vem sendo considerada um possível alvo molecular no tratamento quimioterápico deste e de outros tipos de câncer. Diversos inibidores farmacológicos da atividade de FASN foram desenvolvidos e avaliados em estudos pré-clínicos e apresentaram resultados promissores, no entanto, a maioria deles tem limitações conferidas pelas suas propriedades farmacológicas ou seus efeitos colaterais. TVB-3166 é um novo inibidor reversível de FASN, potente e seletivo, que exibe forte efeito antiproliferativo e ampla atividade antitumoral em diferentes linhagens celulares e modelos xenográficos. Além disso, TVB-2640, análogo de TVB-3166, já está sendo testado clinicamente em pacientes com tumores sólidos avançados, com evidências promissoras de eficácia clínica. Embora a estrutura química do TVB-2640 ainda não tenha sido publicada, evidências sugerem que seja similar ao TVB-3166. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar, em ensaios *in vitro*, os efeitos do inibidor de FASN TVB-3166 nas linhagens celulares derivadas de CEC de língua SCC-9 ZsG e LN-1A. Para isto, as células foram tratadas com TVB-3166, em suas respectivas IC₂₅ e IC₅₀ e avaliadas com relação à viabilidade celular, proliferação, progressão do ciclo celular, taxas de apoptose e necrose, atividade das metaloproteinases de matriz (MMPs) -2 e -9, migração e adesão celular. A viabilidade celular foi reduzida de maneira progressiva em ambas as linhagens celulares e, a IC₅₀ obtida foi de 30 µM para as células SCC-9 ZsG e 37 µM para a linhagem metastática LN-1A. TVB-3166 provocou o acúmulo de células na fase G0/G1 e redução considerável do número de células na fase S, bem como aumentou as taxas de apoptose e de necrose nas células SCC-9 ZsG e LN-1A. A proliferação e a migração celular foram reduzidas nas células SCC-9 ZsG em todos os períodos de tempo avaliados, entretanto na linhagem metastática LN-1A, a redução da proliferação e migração celular ocorreram somente após os períodos de 24 e

12 horas, respectivamente. Nas duas linhagens estudadas, TVB-3166 não alterou as atividades das MMPs -2 e -9, no entanto, aumentou a adesão ao miogel. Em conjunto, os dados aqui apresentados revelam a atividade antitumoral de TVB-3166 em células de CEC oral e servem de base para futuros ensaios *in vivo* para avaliar o seu potencial para aplicação clínica em CECs orais.

Palavras-chave: Carcinoma espinocelular oral. Ácido graxo sintase. TVB-3166.

ABSTRACT

Oral squamous cell carcinoma (OSCC) accounts for more than 90% of malignancies affecting the oral cavity and is characterized by its considerable degree of early relapse, cervical lymph node metastasis, and low survival rates. Surgery is the main therapeutic modality for OSCC, however, in advanced stages, patients are included in radiochemotherapy protocols. Several studies have shown that the metabolic enzyme fatty acid synthase (FASN), responsible for the endogenous biosynthesis of long chain fatty acids, has increased expression in several malignancies, including OSCC, in which it seems to be associated with a worse prognosis. Several pharmacological FASN inhibitors have been developed and evaluated in preclinical studies with promising results; however, most of them have limitations conferred by their pharmacological properties and side effects. TVB-3166 is a recently described, potent, selective, and reversible FASN inhibitor that exhibits strong antiproliferative effect and significant antitumor activity in different cell lines and xenographic models. In addition, TVB-2640, an analog of TVB-3166, is already being clinically tested with promising evidences of clinical efficacy. Although the chemical structure of TVB-2640 has not yet been published, it may show chemical similarity with TVB-3166. Therefore, the objective of this study was to evaluate *in vitro* assays the effects of TVB-3166 on SCC-9 ZsG and LN-1A cells derived from human oral tongue OSCC. The cells were treated with TVB-3166 in their respective IC₂₅ and IC₅₀ and evaluated for cell viability, proliferation, cell cycle progression, apoptosis and necrosis, matrix metaloproteinase (MMP) -2 and -9 activity, migration, and cell adhesion. Cell viability was reduced in a dose-dependent manner in both cell lines and the IC₅₀ was 30 μ M for SCC-9 ZsG and 37 μ M for the metastatic cell line LN-1A. TVB-3166 resulted in the accumulation of cells in the G0/G1 phase and diminished the number of cells in the S phase, as well as increased rates of apoptosis and necrosis in SCC-9 ZsG and LN-1A cells. Cell proliferation and migration were reduced in SCC-9 ZsG cells in all studied time points, however, in LN-1A cells these effects occurred after the 24 and 12 hours, respectively. In both cell lines, TVB-3166 did not change MMP -2 and -9 activity, nevertheless, increased cell adhesion to myogel. Taken together, the data presented here show the antitumor activities of TVB-3166 in OSCC cells and may serve as a basis for future *in vivo* assays to evaluate the clinical potential for application in OSCC patients.

Key words: Oral squamous cell carcinoma. Fatty acid synthase. TVB-3166

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μL: Microlitro

μM: Micromolar

7-AAD: *7- Aminoactinomycin D*

ACP: *Acyl carrier protein* – Proteína transportadora de acil

AKT: *Serine/threonine-specific protein kinase* - Proteína quinase B

ATCC: *American Type Culture Collection*

BSA: *Bovine serum albumin* – Albumina de soro bovino

CEC: Carcinoma espinocelular

DMEM/F-12: *Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12*

DMSO: Dimetil sulfóxido

DNA – *desoxyribonucleic acid* - Ácido desoxirribonucléico

EDTA – *Ethylenediamine tetraacetic acid* - Ácido etilenodiamino tetracético

EGCG: *Epigallocatechin gallate* - epigallocatequina-3-galato

EGF/EGFR: *Epidermal growth facto/receptor* - Receptor/Fator de crescimento epidérmico

ErbB ou HER2: *Epidermal Growth Factor Receptor* - Receptor de fator de crescimento epidérmico

ERK: *Extracellular signal-regulated kinases* - Quinases regulatórias de sinais extra-celulares

FAK: *Focal adhesion kinase* – Quinase de adesão focal

FASN: *Fatty acid synthase* – Ácido graxo sintase

FDA: *Food and Drug Administration*

HIF: *Hypoxia Inducible Factor* – Fator indutor de hipóxia

HPV: Papilomavírus humano

kDa – *Kilodalton* - Quilodalton

IC₅₀: *Half maximal inhibitory concentration* – Concentração inibitória média

INCA: Instituto Nacional do Câncer

MEK: *Mitogen-activated protein* - Proteína ativada por mitógeno

MET: *Hepatocyte growth factor receptor* - Receptor do fator de crescimento de hepatócitos

MMP: *Matrix metalloproteinase* - Metaloprotease de Matriz

MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

PARP: *Poli (ADP-ribose) polymerase*

PAX: *Paxicillin* – Paxicilina

PBS: *Phosphate Buffered Saline* - Solução salina tamponada com fosfato

PDX: *Patient-derived tumor xenografts* – Tumores xenográficos derivados de pacientes

PerCP: *Peridinin-chlorophyll-protein complex*

PI3K: *Phosphatidylinositol - 3 - kinase* - Fosfatidilinositol - 3 – quinase

RhoA- *family of GTPases* – Família de GTPases

RNAi: RNA de interferência

SDS: *Sodium dodecyl sulfate* - Dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE: *Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*

SFB: Soro fetal bovino

SREBP: *Sterol regulatory element binding proteins* - Proteínas ligantes da região regulada por proteínas

USP2a - *Ubiquitin-specific protease 2a*

VEGF/VEGFR: *Vascular endothelial growth factor/receptor* – Receptor/Fator de Crescimento Endotelial Vascular

Xg: Força centrífuga g

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1 Carcinoma espinocelular (CEC) oral	18
2.2 Ácido graxo sintase (FASN)	21
2.3 Inibidores farmacológicos de FASN	26
2.4 TVB-3166	33
2.5 FASN em CEC oral	36
3. PROPOSIÇÃO	38
4. MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1 Cultura de células	39
4.2 Preparo da solução de TVB-3166	40
4.3 Análise da viabilidade celular por MTT e cálculo da IC ₅₀	40
4.4 Análise da proliferação celular	41
4.5 Análise do ciclo celular	42
4.6 Avaliação das taxas de morte celular por apoptose e necrose	42
4.7 Migração celular	42
4.8 Ensaio zimográfico	43
4.9 Análise da adesão celular	45
4.10 Forma de análise dos resultados	46

5. RESULTADOS	47
5.1 Efeito do TVB-3166 sobre a viabilidade das células SCC-9 ZsG e LN-1A e cálculo da IC ₅₀	47
5.2 Alterações morfológicas induzidas pelo tratamento com TVB-3166 nas células SCC-9 ZsG e LN-1A	50
5.3 Efeito do TVB-3166 sobre a proliferação das células SCC-9 ZsG e LN-1A	52
5.4 Efeito do TVB-3166 sobre a distribuição das células SCC-9 ZsG e LN-1A nas fases do ciclo celular	53
5.5 Efeito do TVB-3166 sobre as taxas de morte celular por apoptose e necrose nas células SCC-9 ZsG e LN-1A	55
5.6 Efeito do TVB-3166 sobre a migração das células SCC-9 ZsG e LN-1A	58
5.7 Efeito do TVB-3166 sobre a atividade gelatinolítica das MMPs -2 e -9 secretadas pelas células SCC-9 ZsG e LN-1A	61
5.8 Efeito do TVB-3166 sobre a adesão das células SCC-9 ZsG e LN-1A ao miogel	65
6. DISCUSSÃO	68
7. CONCLUSÃO	78
REFERÊNCIAS	79
ANEXO 1: Verificação de originalidade e prevenção de plágio	94

1 INTRODUÇÃO

O câncer oral é considerado um grave problema de saúde mundial, correspondendo a aproximadamente 2% de todos os casos de câncer no mundo. Anualmente, estima-se que 170.000 mortes sejam causadas no mundo pelo câncer de boca, das quais 77% ocorrem em países em desenvolvimento (Bray et al., 2018). O carcinoma espinocelular (CEC) é a neoplasia maligna mais comum da cavidade oral, compreendendo mais de 90% de todos os casos, sendo caracterizado por crescimento invasivo com propensão para invasão local, emissão de metástases precoces para os linfonodos regionais e à distância (Bagan et al., 2010). Os CECs de língua geralmente apresentam prognóstico pior do que os CECs de outros locais da cavidade oral (Amar et al., 2013). O estadiamento clínico da doença e a localização do tumor norteiam o tratamento do CEC oral, para o qual a cirurgia representa a principal modalidade terapêutica, no entanto, quando em estádios avançados, os pacientes são incluídos em protocolos radioquimioterápicos (Kowalski et al., 2005). Atualmente, as principais drogas quimioterápicas utilizadas no tratamento do CEC oral incluem os agentes platínicos (cisplatina e carboplatina), taxanos (paclitaxel e docetaxel) e drogas antimetabólicas (5-fluorouracil e metotrexano), de maneira isolada ou em diferentes combinações (Fury e Pfiser, 2011; Hartner., 2018). Apesar dos avanços tecnológicos e científicos, o CEC oral ainda apresenta prognóstico ruim e baixas taxas de sobrevida, as quais permanecem em torno de 55% após 5 anos, fato que realça a importância da busca por terapias mais eficientes do que as hoje existentes (Cohen-Goldenberg et al., 2018).

A ácido graxo sintase (FASN) é a enzima metabólica responsável pela síntese de ácidos graxos (AG) saturados de cadeia longa a partir dos precursores malonil-CoA e acetil-CoA, tendo como produto final o AG saturado palmitato (Kuhajda et al., 2000). A expressão e a atividade de FASN são geralmente baixas ou até mesmo ausentes na maioria dos tecidos humanos normais, porém estão aumentadas em diversas neoplasias malignas, incluindo o CEC oral (Flavin et al., 2010). Vários estudos correlacionam a atividade aumentada de FASN com agressividade tumoral, resistência aos quimioterápicos e reduzida sobrevida de pacientes em diferentes tipos de tumores, sugerindo que a esta enzima desempenha um papel importante na biologia das células tumorais e na resposta terapêutica, o que faz de FASN um possível alvo quimioterápico (Witkiewicz et al., 2008; Murata et al., 2010; Zaytseva et al., 2012). Trabalhos prévios do nosso grupo de pesquisa mostraram que FASN é importante para a proliferação de células derivadas de CECs orais e sua alta expressão foi fortemente associada à progressão da doença, bem como se correlacionou com maior risco de recorrência e menor

tempo de sobrevida para os pacientes portadores de CECs de língua (Agostini et al., 2004; Silva et al., 2008b, 2008c).

Vários compostos são capazes de inibir a atividade de FASN, dentre eles a cerulenina, seu análogo sintético C75 e o orlistat (Menendez & Lupu, 2007). Estes compostos já foram extensivamente utilizados em diferentes modelos pré-clínicos e, em nosso laboratório, já foi demonstrada a eficácia do orlistat em diferentes linhagens celulares e modelos animais de CEC oral e de melanoma. Nestes estudos foram descritos efeitos como redução da proliferação, aumento da apoptose, diminuição da disseminação metastática, além da modulação da angiogênese e da linfangiogênese (Carvalho et al., 2008; Seguin et al., 2012; Agostini et al., 2014; Bastos et al. 2017). Embora vários inibidores de FASN tenham exibido efeitos citotóxicos potentes em diferentes linhagens celulares e modelos xenográficos, a maioria deles, incluindo o orlistat, apresentam limitações importantes conferidas pelas suas propriedades farmacológicas e seus efeitos colaterais, o que dificulta ou impede sua utilização clínica (Menendez e Lupu, 2017). Entretanto, a criação de inibidores da atividade de FASN mais potentes e seletivos, como o TVB-3166, representa um avanço significativo em relação aos inibidores primeiramente descritos na literatura e aumenta a possibilidade de FASN se tornar um alvo terapêutico com aplicação clínica (Bueno e Colomer, 2015; Buckley et al., 2017).

O TVB-3166 é um inibidor reversível da atividade FASN que inibe eficientemente e em baixas doses a síntese de palmitato. Estudos já demonstraram que o TVB-3166 possui potente efeito antiproliferativo sobre diferentes linhagens celulares e exibe significativa atividade antitumoral em diversos modelos xenográficos, sendo bem tolerado em animais de laboratório. Adicionalmente, TVB-3166 interfere no remodelamento das membranas celulares e nas proteínas associadas aos “*rafts lipídicos*”, provocando a inibição das principais vias oncogênicas, especialmente PI3K-AKT-mTOR e β -catenina, além de induzir a reprogramação da expressão gênica (Oslob et al., 2012; Ventura et al., 2015; Heuer et al., 2017). Além disso, TVB-3664, análogo do TVB-3166, foi capaz de reduzir a migração celular, a formação de complexos de adesões focais e a degradação de gelatina, sugerindo que a inibição de FASN pode ter um papel importante no controle da disseminação metastática de neoplasias malignas (Jafari et al., 2018). Por fim, é importante ressaltar que o TVB-2640, outro análogo do TVB-3166, é o primeiro inibidor de FASN a ser testado clinicamente e, atualmente, encontra-se em ensaio clínico fase II sob a forma de monoterapia ou combinado com outros agentes, já apresentando evidências promissoras de eficácia clínica em doses bem

toleradas pelos pacientes (O'Farrell et al., 2016). Embora a estrutura química do TVB-2640 ainda não tenha sido publicada, evidências sugerem que este composto possui similaridade química com TVB-3166 (Buckley et al., 2017).

Mediante o exposto, no presente estudo investigamos pela primeira vez os efeitos *in vitro* do TVB-3166 sobre as células de CEC oral SCC-9 ZsG e a linhagem metastática LN-1A, dela derivada, ambas estabelecidas em nosso laboratório. Os resultados aqui apresentados poderão servir de base para futuros ensaios pré-clínicos que permitam compreensão do potencial antitumoral deste inibidor de FASN em CECs orais.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Carcinoma espinocelular (CEC) oral

O câncer oral é considerado um grave problema de saúde mundial, correspondendo a aproximadamente 2% de todos os casos de câncer no mundo, sendo responsável pelo surgimento de cerca de 350.000 novos casos. Anualmente, estima-se que 170.000 mortes sejam causadas no mundo pelo câncer de boca, das quais 77% ocorrem em países em desenvolvimento (Bray et al., 2018). As maiores taxas de incidência são observadas nas regiões centro-sul da Ásia, América Latina e na África subsaariana (Shield et al., 2017). Na América do Sul, as maiores taxas ocorrem no Brasil, com incidência até três vezes maior quando comparada a outros países da América do Sul (Curado et al., 2016). No Brasil, de acordo com os dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), estimam-se para o biênio de 2018/2019, 14.700 novos casos de câncer bucal, sendo 11.200 casos em homens e 3.500 casos em mulheres, o que coloca este tipo de câncer na sétima colocação em incidência na população brasileira. Na região sudeste, sem considerar os tumores de pele não melanoma, o câncer de boca em homens representa o quarto mais frequente. Em 2015, 4.672 homens e 1.2267 mulheres morreram em decorrência da doença no país (INCA, 2018).

O carcinoma espinocelular (CEC), também denominado de carcinoma de células escamosas ou carcinoma epidermóide, é o tumor maligno mais comum da cavidade oral, compreendendo mais de 90% de todos os casos (Sloan et al., 2017). Os principais fatores de risco associados ao seu desenvolvimento incluem o tabagismo, o etilismo e a interação entre ambos, que possui forte sinergismo. O risco aumentado para o câncer oral está diretamente relacionado com a quantidade consumida e o tempo de exposição a estes dois fatores (Scully e Bagan, 2009). Outros fatores de risco incluem o papilomavírus humano (HPV) para os CECs de orofaringe, a radiação ultravioleta (CECs de lábio) e a imunossupressão (Neville et al., 2016).

Classicamente, o CEC oral afeta homens entre a sexta e sétima décadas de vida, tabagistas e etilistas crônicos. Entretanto, uma mudança nesse perfil tem sido observada nas últimas décadas devido a um aumento na incidência de CEC de boca em pacientes jovens (antes dos 45 anos de idade), incluindo mulheres, sem associação com os principais fatores de risco (Santos-Silva et al., 2014; Zhang et al., 2017). O CEC oral possui diferentes

apresentações clínicas, podendo exibir lesões leucoplásicas, eritroplásicas ou leucoeritroplásicas, com dor mínima nos estágios iniciais. Conforme a condição progride, o CEC pode produzir aumentos de volume intraorais e levar a formação de úlceras que tipicamente apresentam as bordas elevadas, endurecidas e não cicatrizam (Bagan et al., 2010). Estas lesões podem estar presentes em qualquer sítio da cavidade oral, contudo, a língua e o assoalho de boca são os locais mais comumente afetados (Chi et al., 2015). Microscopicamente, o CEC é caracterizado pela presença de ilhas e cordões de células epiteliais malignas que invadem o tecido conjuntivo subjacente. Diferentes graus de diferenciação escamosa podem estar presentes, entretanto, CECs bem ou moderadamente diferenciados correspondem à maioria dos casos. Pérolas de queratina, hipercromatismo e graus variados de pleomorfismo nuclear e celular podem ser vistos nas ilhas tumorais (Neville et al., 2016; Sloan et al., 2017;).

O CEC oral é caracterizado por crescimento invasivo, com propensão para invasão local, metástase precoce para os linfonodos regionais e à distância. Atualmente, a presença de metástases nos linfonodos do pescoço é considerada o fator prognóstico mais importante para a sobrevida global dos pacientes. Além disso, a recorrência local e o desenvolvimento de um segundo tumor primário também tem impacto negativo no prognóstico dos pacientes portadores de CECs de boca (Kowalski et al., 2005; Chen et al., 2015). Os CECs de língua geralmente apresentam prognóstico pior do que os CECs de orofaringe e de outros locais da cavidade oral (Amar et al., 2013; Almangush et al., 2015). A maioria dos pacientes é diagnosticada em estágio avançado da doença, com presença de metástases cervicais no momento do diagnóstico. Curado et al. (2016) avaliaram o estágio clínico de pacientes com CEC oral no Oncocentro de São Paulo e verificaram que 65% destes pacientes apresentavam doença avançada no momento do diagnóstico (estádio III e IV), enquanto apenas 27% foram diagnosticados em estágios iniciais (estádios 0, I e II). Apesar dos avanços tecnológicos em novas terapias, nos últimos 50 anos, a taxa de sobrevida em 5 anos permaneceu em torno dos 50% em decorrência, principalmente, do diagnóstico tardio (Warnakulasuriya, 2009; Cohen-Goldemberg et al., 2018).

O estadiamento clínico da doença e a localização do tumor guiam o tratamento do CEC oral. Devido ao diagnóstico tardio, o tratamento é na maioria das vezes complicado, podendo envolver diferentes tipos de terapia, como a cirurgia, radioterapia e quimioterapia (Argiris et al., 2008). A cirurgia é o tratamento padrão para os CECs de boca, mas é frequentemente limitada pela extensão anatômica do tumor, podendo implicar em grandes

mutações com consequências importantes em funções como deglutição e fonação. Além disso, a radioterapia é tipicamente aplicada no pós-operatório em tumores localmente avançados (Omura et al., 2014). A quimioterapia, associada ou não à radioterapia, é indicada na ocorrência de metástase à distância, em tumores irresssecáveis ou recorrentes. Atualmente, as principais drogas utilizadas no tratamento do CEC oral incluem os agentes platínicos, como a cisplatina e carboplatina, que geralmente são administrados concomitantemente à radioterapia (radioquimioterapia), potencializando sua ação. No entanto, em casos selecionados, a quimioterapia neoadjuvante pode ser indicada, e consiste na administração dos agentes platínicos combinados com outros quimioterápicos, que incluem os taxanos, especialmente o paclitaxel e docetaxel, bem como drogas antimetabólicas (5-fluorouracil e metotrexano), precedendo a radioterapia (Fury e Pfiser, 2011; Hartner et al., 2018). Mais recentemente, diversos estudos têm demonstrado a eficácia da imunoterapia com cetuximabe, um anticorpo monoclonal direcionado contra o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), em associação à radioterapia ou quimioterapia, cujos resultados revelam aumento das taxas de sobrevida em pacientes com CECs de cabeça e pescoço recorrentes ou metastáticos (revisado por Moy et al., 2017; Yanamoto et al., 2018).

O CEC bucal, de forma similar a maioria das neoplasias malignas, origina-se do acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas, que ocorrem em genes que regulam a proliferação, sobrevivência e diferenciação celular (Sinevici e O'Sullivan, 2016). Em CECs de cabeça e pescoço, os estudos genômicos mais recentes revelam que há uma clara divergência entre as alterações e taxas de mutações quando são comparados os tumores associados ao HPV (HPV⁺) e relacionados ao tabagismo e etilismo (HPV⁻) (Puram e Rocco, 2015). Através do sequenciamento completo do exoma de 279 amostras de CECs de cabeça e pescoço, o Atlas do Genoma do Câncer identificou as principais mutações genéticas somáticas presentes nestes tumores e concluiu que os tumores HPV⁻ apresentam maior instabilidade genômica. Além disso, o estudo concluiu que os tumores associados ao HPV apresentam maiores taxas de mutações no oncogene *PIK3CA*, perda de função de *TRAF3* e amplificação do gene regulador do ciclo celular *E2F1*. Em contraste, tumores relacionados ao tabagismo e etilismo apresentaram a mutação no gene supressor de tumor *TP53* em 84% dos casos, inativação de *CDKN2A* e amplificação cromossômica de 3q26/28 e 11q13/22. Adicionalmente, mutações em oncogenes (*CCND1*, *MYC* e *HRAS*), receptores de tirosina quinase (*EGFR*, *FGFR1* e *ErbB2*), *PTEN* e *NF1* também foram identificadas (Cancer Genome Atlas Network, 2015).

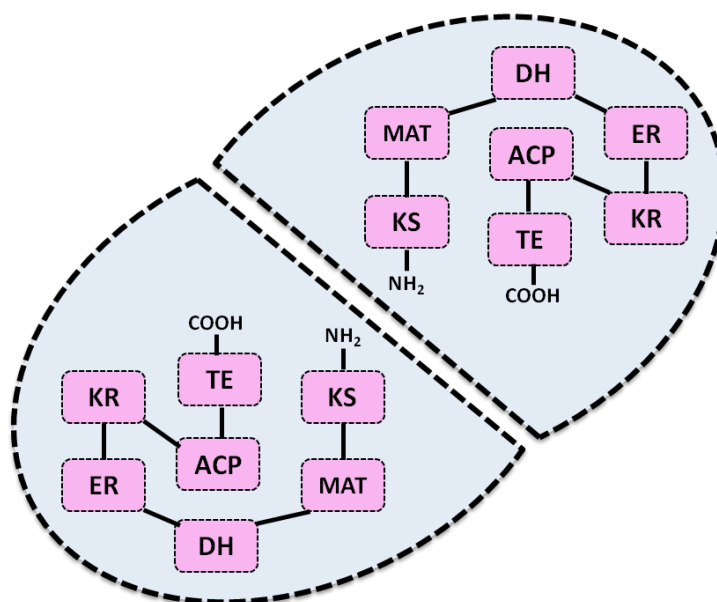
2.2 Ácido graxo sintase (*Fatty acid synthase* - FASN)

Os ácidos graxos (AG) são componentes estruturais das membranas celulares, atuam como intermediários na biossíntese de hormônios e de outras moléculas biologicamente essenciais e são importantes substratos para o metabolismo energético, sendo obtidos a partir da dieta ou produzidos *de novo* pela enzima ácido graxo sintase (FASN). FASN é a enzima metabólica responsável pela biossíntese de AG saturados de cadeia longa, por meio da condensação dos precursores acetil-CoA e malonil-CoA na presença da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH), que atua como cofator (Kuhajda et al., 2000; Menendez et al., 2007; Flavin et al., 2010). Seu principal produto enzimático é o palmitato, um AG saturado de 16 carbonos, que pode ser conjugado a proteínas ou convertido em outros AG e lipídios complexos fundamentais para síntese das membranas celulares e “*rafts lipídicos*”, modificações de proteínas, assim como para a localização e sinalização de receptores associados a vias oncogênicas, como PI3K-AKT-mTOR (Jones e Infante, 2015; Röhring e Schulze, 2017). Adicionalmente, FASN também desempenha um papel importante na homeostase energética, convertendo o excesso de carbono em AG para o armazenamento. Quando necessário, estes fornecem energia via β -oxidação (Kuhajda et al., 2000)

Durante os últimos anos, importantes avanços na compreensão da organização estrutural e funcional de FASN ocorreram por meio da combinação de abordagens bioquímicas, microscopia eletrônica e cristalografia de raios-X. Em mamíferos, FASN é uma enzima multifuncional complexa constituída por dois monômeros idênticos. Cada monômero, com massa molecular de aproximadamente 270 kDa, é composto por um domínio da proteína transportadora de acil (ACP) e seis diferentes domínios catalíticos (**figura 1**), que são distribuídos a partir da extremidade amino terminal em direção à carboxil terminal obedecendo a seguinte ordem: β -cetoacil sintase, acetil-CoA e malonil-CoA transferase, β -hidroxiacil desidratase, enoil redutase, β -cetoacil redutase, ACP e o domínio tioesterase (Stoops e Wakil, 1981; Witkowski et al., 1991; Menendez e Lupu, 2007). Embora cada monômero de FASN contenha todas as atividades necessárias para a síntese de palmitato, somente a forma dimérica é funcional. Por meio de técnicas proteolíticas, foi determinado que os monômeros de FASN encontravam-se dispostos em um arranjo linear, descrito como cabeça-a-cauda (*head-to-tail*), gerando dois centros para a síntese de palmitato (Brink et al., 2002). No entanto, um modelo alternativo foi proposto por Maeir et al. (2006), que descreveram a disposição destes monômeros em um arranjo paralelo em forma de X,

conferindo assim maior flexibilidade conformacional, que parece contribuir para a eficiência catalítica (revisado por Maeir et al., 2010).

Figura 1 – Representação do complexo enzimático da ácido graxo sintase (FASN). Homodímero formado por duas cadeias polipeptídicas multifuncionais, contendo sete sítios catalíticos em cada cadeia, distribuídos a partir da extremidade amino terminal na seguinte ordem: β -cetoacil sintase (KS – *ketoacyl synthase*); acetil-CoA e malonil-CoA transferases (MAT – *malonyl/acetyl transferase*); β -hidroaxil desidratase (DH – *dehydratase*); enoil redutase (ER – *enoyl reductase*); β -cetoacil redutase (KR – *ketoacyl reductase*); proteína transportadora de acil (ACP – *acyl carrier protein*) e tioesterase (TE – *thioesterase*). Estes sítios catalíticos atuam em sequência até a liberação da molécula de palmitato recém-sintetizada.



Fonte: Modificado a partir de Menendez e Lupu, 2007.

Na maioria dos tecidos humanos normais, a maior parte dos AG utilizados pelas células são provenientes da dieta, portanto, a síntese *de novo* de AG é normalmente suprimida e a expressão da enzima FASN é mantida em níveis baixos, com exceção de tecidos lipogênicos como tecido adiposo, fígado, glândulas mamárias durante a lactação, endométrio na fase proliferativa e pulmões de recém nascidos (Weiss et al., 1986; Kuhajda, 2000; Chirala et al., 2003, Menendez et al., 2005a). Por outro lado, o oposto é observado em células malignas, onde a maior parte dos AG provém da síntese endógena. Este achado começou a ficar evidente com Medes et al. (1953) que estudaram a lipogênese em tecidos neoplásicos de

camundongos e verificaram que a biossíntese endógena de AG ocorre em taxas muito elevadas. Em meados da década de 1980, ficou estabelecido que a síntese *de novo* de AG pode representar mais de 93% de triacilglicerol em células tumorais, independentemente dos níveis lipídicos circulantes (Ookhtens et al., 1984). No entanto, Kuemmerle et al. (2011) demonstraram que, além da lipogênese *de novo*, as células malignas também podem adquirir AG a partir da dieta por meio da captação na corrente sanguínea. Mais recentemente, foi demonstrado que uma dieta rica em lipídios aumenta especificamente o potencial metastático de células que expressam altos níveis CD36, um receptor de AG, e o bloqueio deste receptor com anticorpos neutralizantes em células CD36⁺, inibiu quase completamente as metástases em modelo ortotópico de CEC oral (Pascual et al., 2017). A partir destes dados, verificou-se que a lipogênese aumentada em células neoplásicas malignas reflete-se na expressão e atividade significativamente elevadas de numerosas enzimas lipogênicas, incluindo a FASN (Swinnen et al., 2006).

Em 1989, foi relatado a identificação imunológica do antígeno oncogênico-519 (OA-519) em pacientes com câncer de mama com pior prognóstico (Kuhajda et al., 1989). No câncer de próstata, a expressão de OA-519 foi correlacionada com tumores de alto grau histológico e doença em estágio avançado, sugerindo este antígeno como potencial marcador prognóstico (Shurbaji et al., 1992). Mais tarde, em células de câncer de mama, Kuhajda et al. (1994) identificaram, por meio de estudos enzimáticos e de sequenciamento, que OA-519 correspondia a FASN. Desde esta observação inicial, a expressão elevada de FASN foi detectada em diversas neoplasias malignas de origem epitelial, incluindo mama (Alo et al., 1996), ovário (Pizer et al., 1996), próstata (Rossi et al., 2003), cólon (Visca et al., 1999), pulmão (Piyathilake et al., 2000), pâncreas (Alo et al., 2007), estômago (Kusakabe et al., 2002), bexiga (Sugino et al., 2011), melanoma (Innocenzi et al., 2003) e CEC oral (Krontiras et al., 1999), bem como sarcomas de tecidos moles (Takahiro et al., 2003), mieloma múltiplo (Wang et al., 2008) e linfoma não-Hodgkin (Uddin et al., 2010). Os dados disponíveis até o momento sugerem que a elevada atividade de FASN confere não somente vantagem seletiva de crescimento para as células malignas, mas também regula a proliferação e sobrevivência, participa do metabolismo e das vias de transdução de sinais, assim como modula o desenvolvimento, manutenção e progressão metastática de neoplasias malignas (Baron et al., 2004; Menendez e Lupu, 2007).

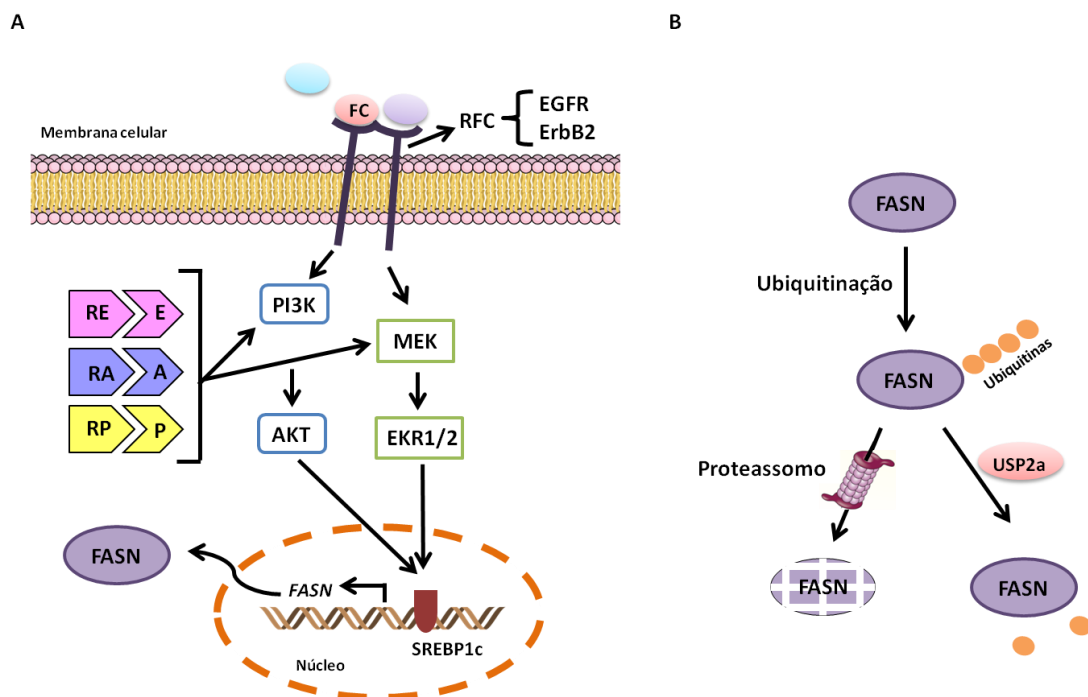
Vários estudos correlacionam a atividade aumentada de FASN com agressividade tumoral, reduzida sobrevida de pacientes e resistência aos quimioterápicos em diferentes tipos de tumores (Alo et al., 2007; Witkiewicz et al., 2008; Murata et al., 2010; Zaytseva et al., 2012). Neste contexto, Liu et al. (2008) demonstraram que a expressão elevada de FASN contribui funcionalmente para o aumento de resistência a fármacos, especificamente a adriamicina e mitoxantrona, em linhagens celulares de câncer de mama (MCF7/ AdVp 3000 e MDA-MB-468). Adicionalmente, verificaram que a inibição seletiva da expressão de FASN em células epiteliais normais de mama (MCF10A1) não altera o nível de resposta aos fármacos, sugerindo assim, que a expressão elevada de FASN provavelmente causa resistência às drogas. Com base nestes achados, acredita-se que a FASN pode ser um alvo ideal de quimiossensibilização para terapia combinada no tratamento de neoplasias malignas resistentes (Menendez e Lupu, 2007; Flavin et al., 2010). Além de conferir vantagens proliferativas e resistência às células malignas, estudos revelaram que FASN desempenha um papel oncogênico central na etiologia de neoplasias malignas. Vazquez-Martin et al. (2008) demonstraram que a regulação positiva da expressão e atividade de FASN em células epiteliais mamárias normais (HBL100) pode, por si só, desencadear a ativação de receptores tirosina quinase HER1/HER2 que, por sua vez, induzem um fenótipo semelhante ao do câncer de mama. Apoiando estes achados, Migita et al. (2009) verificaram que o aumento da expressão de FASN em células epiteliais de próstata imortalizadas (iPrECs) aumenta significativamente o crescimento e a proliferação celular, enquanto protege estas células da apoptose, tornando-as tumorigênicas. Estas descobertas evidenciam que FASN participa como uma oncoproteína metabólica no processo de transformação malignas de células epiteliais.

A regulação da expressão de FASN em células malignas é complexa e envolve o controle transcricional (**figura 2 A**) e pós-traducional (**figura 2 B**), atuando em conjunto com diversas influências do microambiente tumoral. Apesar de não serem totalmente compreendidos, os principais mecanismos que estimulam a transcrição do gene *FASN* estão associados a via do fator de crescimento epidérmico (EGF), por meio dos receptores EGFR e ErbB2, e a via dos hormônios esteroides (estrogênio, progesterona e andrógenos) e seus respectivos receptores (Flavin et al., 2010). De uma maneira geral, os receptores ErbB-2 e EGFR, interagem e ativam as vias de sinalização PI3K-AKT e MEK-EKR1/2 com subsequente ativação transcricional da expressão de FASN. Similarmente, a ativação exacerbada de AKT e EKR1/2 podem ocorrer em órgãos hormonalmente sensíveis (mama, endométrio, ovário e próstata) por meio da ativação de receptores de hormônios esteroides.

No entanto, a expressão de FASN pode ser amplificada pela a interferência mútua entre estas duas vias reguladoras (Mashima et al., 2009). Por fim, os sinais gerados por ambas as vias de transdução de AKT e ERK1/2 controlam a expressão ou maturação nuclear de SREBP1c (*sterol regulatory element binding protein 1c*) que, por sua vez, interage com o sítio de ligação do complexo SREBP no promotor do gene *FASN* (Menendez e Lupu, 2007; Flavin et al., 2010). De fato, o estudo de Menendez et al. (2004) sugere que a inibição de FASN por inibidores farmacológicos ou por RNAi suprime expressão de ErbB2 por meio da regulação de PEA3, um repressor da transcrição de ErbB2, em linhagens celulares de câncer de mama e de ovário.

Além dos fatores envolvidos na transcrição, o acúmulo de FASN pode ocorrer também logo após sua tradução pela interação com a enzima desubiquitinante USP2a. Em linhagem celular derivada de câncer de próstata (LNCaP), foi demonstrado que a USP2a interage com FASN, promovendo a remoção de etiquetas de ubiquitina de moléculas já marcadas para a degradação proteossômica, evitando assim que FASN seja degradada e aumentando, conseqüentemente, sua meia vida (Graner et al., 2004). É importante ressaltar ainda que variações no microambiente tumoral, como a falta de nutrientes e oxigênio, bem como alterações no pH, também interferem na expressão de FASN (Menendez e Lupu, 2007). Em linhagens celulares de câncer de mama, Furuta et al. (2008) demonstraram que FASN é significativamente regulada por hipóxia, em decorrência do aumento de SREBP-1c, via fosforilação de AKT e ativação do HIF1. Além disso, as análises imunoistoquímicas destes autores revelaram que as expressões de FASN e SREBP-1c foram localizadas em regiões de hipóxia em amostras de câncer de mama.

Figura 2 – Regulação da produção de FASN no câncer. **A** – Via dos fatores de crescimento e hormônios esteroides. Fatores de crescimento (FC) se ligam aos seus receptores (EGFR e Erb2) presentes na membrana celular, levando a ativação das principais vias oncogênicas, especialmente PI3K-AKT e MEK-EKR1/2. Além disso, estas mesmas vias podem ser ativadas pela interação entre os hormônios esteroides, tais como estrógeno (E), andrógenos (A) e progesterona (P) e seus respectivos receptores. Por fim, ambas as vias estimulam a expressão de FASN por meio da modulação da expressão de SREBP1c que, por sua vez, se liga na região promotora do gene *FASN*, resultando na sua transcrição. A amplificação da expressão de FASN pode ocorrer por meio da interferência mútua entre as vias dos fatores de crescimento e dos hormônios esteroides. **B** – Regulação da expressão de FASN em nível pós-traducional. A interação entre FASN e a enzima desubiquitinante USP2a, promove a remoção de etiquetas de ubiquitina, evitando a degradação proteossômica de FASN.



Fonte: Modificado a partir de Menendez e Lupu, 2007.

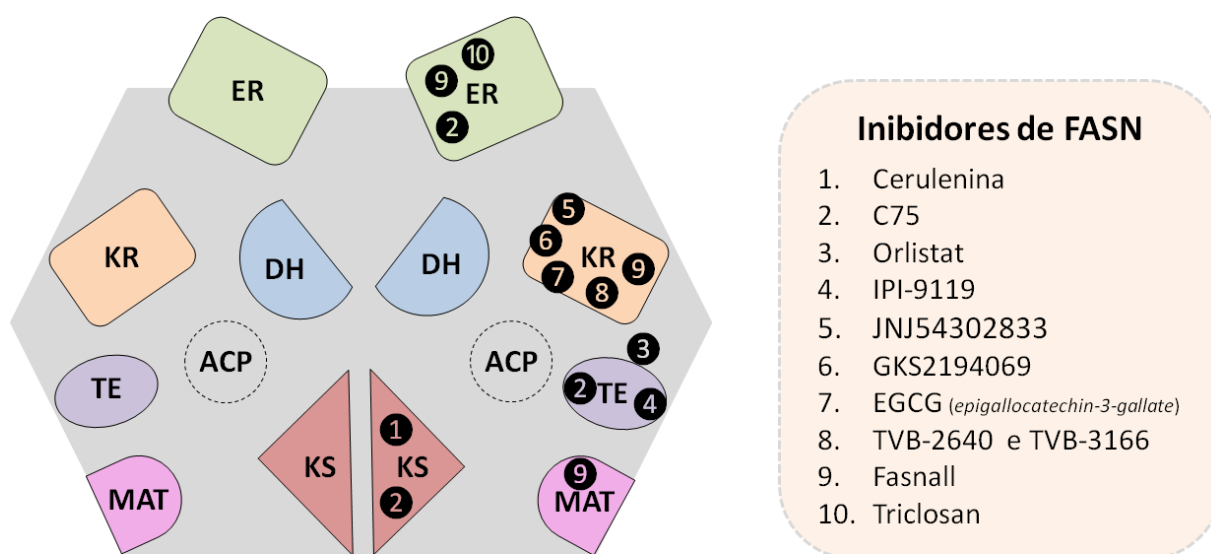
2.3 Inibidores farmacológicos de FASN

A consistente associação entre a produção e atividade de FASN com pior prognóstico e reduzida sobrevida para paciente com vários tipos de neoplasias malignas, sugere que esta enzima seja um bom alvo para o tratamento quimioterápico. Assim, desde a percepção da expressão diferencial de FASN entre tecidos normais e neoplásicos, diversos inibidores farmacológicos da atividade de FASN foram desenvolvidos e avaliados em estudos

pré-clínicos, nos quais seus efeitos estão relacionados à redução significativa da proliferação celular e indução de apoptose (Flavin et al., 2010; Buckley et al, 2017). Diversas evidências experimentais sugerem que os efeitos antitumorais da inibição de FASN são desencadeados pelo acúmulo do substrato malonil-CoA e pela desativação de vias de sinalização oncogênicas por meio do rompimento de estruturas de membrana e dos “*rafts lipídicos*” (Jones e Infante, 2015; Angeles e Hudkins, 2016). De fato, Zhou et al. (2009) demonstraram que a inibição da enzima malonil-CoA descarboxilase provoca efeito citotóxico em células de câncer de mama, induzido pelo acúmulo de malonil-CoA. Além disso, já foi demonstrado em células de câncer de mama que a inibição de FASN é mediada pelo acúmulo de ceramida seguida pela indução de genes pró-apoptóticos como *BNIP3*, *TRAIL* e *DAPK2*, resultando em apoptose (Bandyopadhyay et al., 2006). Adicionalmente, Little et al. (2007) forneceram evidências de que a inibição de FASN induz o estresse do retículo endoplasmático nas células tumorais, aumentando a ocorrência de apoptose.

Os primeiros inibidores da atividade de FASN a demonstrarem atividade antitumoral foram cerulenina, C75 e orlistat, no entanto, apesar dos resultados promissores, estes compostos apresentam limitadas propriedades farmacológicas e efeitos colaterais, o que dificulta a utilização em ensaios clínicos. Entretanto, após o melhor entendimento da organização do complexo enzimático de FASN, novos inibidores foram desenvolvidos com propriedades farmacocinéticas aprimoradas, atuando de maneira seletiva, potente e reversível sobre diferentes sítios catalíticos, estando associados a efeitos adversos mínimos e, conseqüentemente, maiores possibilidades de aplicação clínica (Angeles e Hudkins, 2016). De modo geral, dentre os inibidores da atividade de FASN da última geração estão o GSK2194069, JNJ-54302833, IPI-9119, Fasnall, TVB-2640, TVB-3166 e outros análogos, no entanto, até o momento, apenas o TVB-2640 está sendo testado clinicamente (Jones e Infante, 2015; Menendez e Lupu, 2017). A **figura 3** representa a organização do complexo enzimático de FASN e os sítios catalíticos alvo dos inibidores farmacológicos desta enzima.

Figura 3 – Representação esquemática da organização do complexo enzimático de FASN e os sítios catalíticos alvo de inibidores farmacológicos de FASN. A cerulenina e C75 inibem o sítio β -cetoacil sintase (KS), enquanto o sítio acetil-CoA e malonil-CoA transferases (MAT) é inibido apenas pelo composto Fasnall. Nenhum inibidor atua no sítio β -hidroaxil desidratase (DH). C75, Fasnall e triclosan inibem o sítio enoil redutase (ER) e o sítio β -cetoacil redutase (KR) é inibido por JNJ54302833, GKS2194069, EGCG, TVB-2640, TVB-3166 e Fasnall. C75, orlistat e IPI-9119 inibem o sítio tioesterase (TE).



Fonte: Modificado a partir de Menendez e Lupu, 2017.

O produto natural cerulenina, um antibiótico originalmente isolado do fungo *Cephalosporium ceruleans*, foi um dos primeiros compostos relacionados à inibição da síntese de ácidos graxos e bloqueia irreversivelmente a atividade de FASN por meio de uma ligação covalente no sítio β -cetoacil sintase (Funabashi et al., 1989). Foi demonstrado que a cerulenina inibe a proliferação e induz apoptose em células de câncer de mama, bem como retarda a progressão da doença em modelo xenográfico de câncer de ovário (Pizer et al., 1996; Kuhajda et al., 2000). No entanto, a aplicação *in vivo* da cerulenina é limitada devido à instabilidade química da sua molécula, causada pela presença de um grupo epóxi extremamente reativo que pode interagir também com outras proteínas (Lupu e Menendez, 2006). Sendo assim, o composto semi-sintético C75 foi desenvolvido com a finalidade de contornar a instabilidade química da cerulenina (Kuhajda et al., 2000). O C75 atua como um

inibidor fraco e irreversível de FASN, por meio de sua interação não apenas com o sítio β -cetoacil sintase, mas também com os sítios enoil redutase e tioesterase (Rendina e Cheng, 2005). Estudos mostraram que o C75 apresenta atividade antitumoral em linhagens celulares e modelo xenográfico de câncer de mama (Pizer et al., 2000, além de prevenir o desenvolvimento de câncer mamário em camundongos HER2 transgênicos (Alli et al., 2005). Entretanto, evidências sugerem que tanto a cerulenina quanto o C75, reduzem severamente a ingestão de alimentos e induzem a perda de peso corporal, limitando a utilização destes compostos na prática clínica. A perda de peso parece ocorrer por meio da ativação da oxidação de ácidos graxos a partir da estimulação da carnitina palmitoiltransferase 1 (CPT 1), enquanto a indução da anorexia está associada à inibição da produção do neuropeptídeo Y pelo hipotálamo (Loftus et al., 2000; Thupari et al., 2002).

Triclosan foi inicialmente desenvolvido como agente antibacteriano tópico, sendo utilizado na formulação de sabonetes, dentifrícios e enxaguatórios bucais. No entanto, Liu et al. (2002) observaram que este composto atua também no bloqueio da atividade de FASN por meio da inibição do sítio catalítico enoil-redutase. Ainda neste estudo, demonstraram que o tratamento com baixas concentrações de triclosan inibe a viabilidade e o crescimento das células MCF-7 e SKBr-3 derivadas de câncer de mama. Desde então, a citotoxicidade induzida pelo triclosan tem sido relatada em linhagens celulares de diferentes neoplasias malignas, apresentando um perfil citotóxico maior quando comparado a outros inibidores, como o C75 e orlistat (revisado por Sadowski et al., 2014). Além disso, foi demonstrado em um modelo de carcinogênese mamária em ratos que a inibição de FASN mediada pelo triclosan reduziu significativamente a incidência de tumores, sem causar efeitos na ingestão de alimentos ou no peso corporal dos animais (Lu e Archer, 2005). Assim, estes achados sugerem fortemente que o triclosan não induz efeitos colaterais de supressão do apetite, ativação de CPT-1 e aumento da β -oxidação de ácidos graxos, que impedem a aplicação clínica de cerulenina e C75 (Angeles e Hudkins, 2016). Neste contexto, as tiolactomicinas também foram utilizadas para desenvolver novos inibidores sintéticos da atividade de FASN, sem perda de peso ou efeitos colaterais anorexígenos (McFadden et al., 2005). Um dos representantes desta classe é o C93 (ou FAS93), que apresentou significativa atividade antitumoral em modelos xenográficos de pulmão e ovário, bem como preveniu tumores de pulmão induzidos quimicamente (Zhou et al., 2007; Orita et al., 2008). Outro composto estudado é o C247, que demonstrou significativa eficácia em um modelo transgênico de câncer de mama (Ali et al., 2005), enquanto o composto FAS31 exerceu atividade antitumoral

em modelos xenográficos de câncer de ovário, sem perda de peso considerável ou toxicidade para as células normais de camundongos (El Meskini et al., 2008; revisado por Menendez e Lupu et al., 2017).

O orlistat (tetrahidrolipstatin) é um derivado semissintético da lipstatina, aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento da obesidade por inibir de maneira irreversível as lipases gástricas e pancreáticas, bloqueando assim a absorção de ácidos graxos da dieta (Guercioli et al., 1997; Heck et al., 2000). Esta droga também é capaz de bloquear irreversivelmente a função do sítio tioesterase da FASN, responsável pela liberação do palmitato (Kridel et al., 2004). A descoberta de que o orlistat inibe FASN foi feita por Kridel et al. (2004), por meio de estudos proteômicos de enzimas específicas do câncer de próstata. Neste estudo, o tratamento com orlistat resultou na redução da proliferação de linhagens celulares de câncer de próstata PC3, LNCaP e DU145, com indução concomitante de apoptose e inibição do crescimento tumoral em modelo xenográfico. Além do câncer de próstata, o orlistat demonstrou atividade antiproliferativa e antitumoral em outros modelos *in vitro* e *in vivo*. Menendez et al. (2005a, 2005b) observaram que o tratamento de células derivadas de câncer de mama (SK-Br3) e de estômago (NCI-N87) com orlistat causa aumento do índice apoptótico e bloqueio do ciclo celular em G0/G1. Em culturas primárias de glioma, o orlistat induziu a inibição do crescimento celular e apoptose, acompanhado por redução na expressão de Ki-67 e um aumento na clivagem de caspase-3 (Grube et al., 2014). Adicionalmente, alguns estudos também exploraram o papel antiangiogênico do orlistat. Browne et al., (2006) observaram que esta droga inibe a síntese de ácidos graxos em células endoteliais, acompanhada de redução na proliferação e indução de apoptose. Neste mesmo trabalho, o orlistat reduziu a expressão de VEGFR-2/KDR, um receptor para fatores angiogênicos na superfície celular, apontando assim, uma possível atividade antiangiogênica.

Estudos realizados por nosso grupo de pesquisa mostraram resultados consistentes com orlistat na patogênese do melanoma. Carvalho et al. (2008) demonstraram que o bloqueio de FASN com orlistat reduz a proliferação e provoca apoptose nas células de melanoma murino B16-F10, além de diminuir em aproximadamente 50% o número de metástases espontâneas para linfonodos mediastínicos nos camundongos inoculados com estas células. Zecchin et al. (2011a) acrescentaram, em seguida, que este efeito acontece pela via intrínseca da apoptose, por meio da ativação das caspases -9 e -3 e liberação de citocromo c, de maneira independente da ativação de p53 e da transição da permeabilidade mitocondrial. De acordo, orlistat induz alterações significativas na composição de ácidos graxos em mitocôndrias de

células B16-F10, reduzindo a síntese de ácido palmítico, bem como os ácidos araquídico e oleico (Zecchin et al., 2011b). As metástases pulmonares experimentais, produzidas a partir da inoculação das células B16-F10 nas caudas de camundongos também foram reduzidas pelo orlistat em cerca de 53% (Seguin et al., 2012). Ainda neste estudo, o processo de angiogênese peritumoral em melanomas experimentais cutâneos de camundongos foi reduzido, assim como a viabilidade, proliferação e capacidade de formação de capilares sanguíneos em matrigel. Por fim, estes mesmos autores demonstraram o aumento da secreção de VEGFA total e das isoformas pró-angiogênicas VEGFA₁₂₁, ₁₆₅, ₁₈₉ e anti-angiogênicas _{165b} por células SK-MEL-25 de melanoma humano e SCC-9 de CEC de língua. Além da angiogênese, os inibidores de FASN orlistat e cerulenina reduziram a linfangiogênese *in vitro*, em estudos com culturas de células endoteliais linfáticas (Bastos et al., 2017). Neste estudo, o orlistat inibiu a formação de capilares linfáticos, reduziu a viabilidade, proliferação e a migração nas células endoteliais linfáticas (HDLEC). O volume de metástases linfonodais cervicais de camundongos portadores de melanomas experimentais B16-F10 foi reduzido em aproximadamente 39% dos animais tratados com orlistat, bem como a expressão de VEGF-C nestes tecidos tumorais.

Embora tenha demonstrado atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo*, o orlistat possui importantes limitações farmacológicas, como baixa solubilidade e estabilidade, reduzida absorção pela via oral e falta de seletividade, além de efeitos colaterais que restringem sua aplicação em pacientes (Kridel et al., 2007; Flavin et al., 2010). Sendo assim, modificações na estrutura do orlistat foram realizadas com a finalidade de criar compostos com propriedades farmacológicas melhoradas. Dentre os derivados do orlistat desenvolvidos, o nano-orlistat consiste em uma nova formulação com nanopartículas criada para melhorar a permeabilidade e absorção pela via oral (Schcolnik-Cabrera et al., 2018). De fato, estudos mostraram que o nano-orlistat possui níveis semelhantes de inibição da atividade de FASN, no entanto, a citotoxicidade e biodisponibilidade foram significativamente melhoradas em linhagens celulares e modelos xenográficos de câncer de mama (revisado por Menendez e Lupu, 2017).

Recentemente, foram desenvolvidos novos inibidores da atividade de FASN com a finalidade de otimizar a eficácia *in vivo* e melhorar as propriedades farmacocinéticas dos compostos até aqui descritos. Dentre os inibidores da última geração, Fasnall é uma molécula baseada em tiofenopirimidina que atua seletivamente na FASN por meio de ligações nos sítios cetoacil redutase, enoil redutase, acetil-CoA e malonil-CoA transferase, que utilizam

NADPH como co-fator (Buckley et al., 2017). Alwarawrah et al. (2016) realizaram estudos lipidômicos globais em linhagens celulares tratadas com Fasnall, revelando significativas mudanças no perfil lipídico celular, incluindo o aumento de ceramidas, diacilgliceróis e ácidos graxos insaturados, bem como aumento na captação de palmitato exógeno, o qual foi direcionado mais para formação de lipídios neutros do que para moléculas sinalizadoras de fosfolipídios. Neste mesmo estudo, Fasnall provocou redução da proliferação e indução de apoptose em células de câncer de mama, que foi justificada pelo aumento dos níveis de ceramida. Ainda neste estudo, Fasnall exibiu redução significativa do volume tumoral, que foi correlacionada com aumento de sobrevida em modelo xenográfico de câncer de mama. Além disso, estes autores concluíram que Fasnall foi bem tolerado e não induziu qualquer alteração no comportamento alimentar ou perda de peso nos camundongos estudados.

Outro inibidor potente e seletivo é o IPI-9119, um derivado de tetrazolona-carboxamina, que atua irreversivelmente no sítio tioesterase de FASN. Este composto foi inicialmente testado *in vitro* e em modelo xenográfico com células HCT-116 derivadas de câncer colorretal, apresentando boa biodisponibilidade por via oral e com propriedades farmacocinéticas adequadas para estudos *in vivo* (Brophy et al., 2013). Mais recentemente, Zadra et al. (2019) demonstraram que a inibição seletiva da atividade de FASN com IPI-9119 antagoniza o crescimento do câncer de próstata metastático resistente à castração (mCRPC) por meio da reprogramação metabólica e redução da expressão proteica e da atividade transcricional de receptores de andrógenos (AR), incluindo a variante AR-7, que está diretamente associada à este tipo de resistência. Neste estudo, a inibição mediada pelo IPI-9119 provocou redução de proliferação e induziu apoptose em diferentes linhagens celulares de câncer de próstata, bem como provocou estresse do retículo endoplasmático, resultando na redução da síntese protéica. Os resultados *in vivo* deste trabalho revelaram que o IPI-9119 reduziu em cerca de 30% o volume tumoral em modelos xenográficos de mCRPC, com concomitante inibição intratumoral da atividade de FASN. Por fim, IPI-9119 reduziu significativamente o crescimento dos organoides derivados de mCRPC humano, confirmando o efeito antitumoral desta droga.

Embora vários inibidores de FASN tenham mostrado efeitos citotóxicos potentes em diferentes linhagens celulares e modelos xenográficos, está demonstrado que o bloqueio de FASN pode causar efeitos colaterais importantes, incluindo anorexia e perda de peso em camundongos, como já descrito aqui, além de apresentar potencial efeito teratogênico (Clegg et al., 2002; Chirala et al., 2003). Knobloch et al. (2013) demonstraram que FASN é essencial

para a função de células-tronco neurais adultas, levantando preocupações adicionais sobre os efeitos adversos da inibição de FASN. Além disso, alguns estudos sugerem que a produção endógena de ácidos graxos não seja essencial somente para células malignas, e o uso de inibidores de FASN pode afetar o crescimento de células normais (Almeida et al., 2005; Rossoto et al., 2014; Bastos et al., 2017). Entretanto, a criação de inibidores da atividade de FASN mais potentes e seletivos, como o TVB-3166, representa um avanço significativo em relação aos inibidores primeiramente descritos na literatura e pode aumentar as chances de FASN ser um alvo terapêutico passível de aplicação clínica (Bueno e Colomer, 2015; Buckley et al., 2017).

2.4 TVB-3166

TVB-3166 é um composto derivado de imidazopiridinas, altamente potente e seletivo, que inibe a síntese endógena de palmitato pela ligação reversível ao domínio cetoacil-redutase de FASN (Oslob et al., 2012; Ventura et al., 2015). Este composto foi desenvolvido pela companhia farmacêutica 3-V Biosciences após o estudo de Yang et al. (2008), o qual demonstrou que FASN é regulada durante a infecção pelo vírus da hepatite C. Estes autores demonstraram que a diminuição dos níveis de FASN com RNAi ou C75 reduz a replicação viral nas células Huh7 derivadas de hepatoma humano. Neste contexto, Oslob et al. (2012) desenvolveram uma série de inibidores da classe das pequenas moléculas, identificando 21 compostos com atividade antiviral. Ainda neste estudo, foi demonstrado que o composto 19 apresentava alta permeabilidade celular e atividade antiviral considerável, no entanto, possuía elevado peso molecular e natureza altamente lipofílica, o que dificultou a sua utilização em estudos *in vivo*. A partir destas observações iniciais, o análogo TVB-3166 foi desenvolvido com propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas otimizadas e, de fato, Ohol et al. (2015) demonstraram que a inibição da atividade de FASN mediada por TVB-3166 reduz significativamente a replicação de vírus respiratórios tanto em modelo *in vitro* como *in vivo*. Além disso, estudos subsequentes caracterizaram a atividade antitumoral do TVB-3166 em diversos modelos pré-clínicos fornecendo evidências mecanísticas e farmacológicas de que a inibição da atividade de FASN apresenta uma estratégia terapêutica promissora para o tratamento de uma variedade de neoplasias malignas (Ventura et al., 2015; Heuer et al., 2017; Jafari et al., 2018; Zaytseva et al., 2018; Tao et al., 2019).

No estudo de Ventura et al. (2015), TVB-3166 inibiu eficientemente e em baixas doses a síntese de palmitato e reduziu a viabilidade de maneira dose-dependente de mais de 90 linhagens celulares derivadas de tumores sólidos e hematopoiéticos, incluindo mama, ovário, pâncreas e próstata. TVB-3166 também inibiu o crescimento independente de ancoragem de diferentes linhagens malignas e induziu apoptose em linhagem celular de adenocarcinoma de pulmão (Calu-6) e próstata (22Rv1). Estes autores demonstraram ainda que múltiplos mecanismos de ação podem operar em tipos específicos de tumores provocando apoptose das células tumorais. Sendo assim, concluíram que TVB-3166 interfere no remodelamento das membranas celulares e nas proteínas associadas aos “*rafts lipídicos*”, levando a inibição da transdução de sinal por meio das vias PI3K-AKT-mTOR e β -catenina, bem como induz a reprogramação da expressão gênica, provocando inibição de efetores oncogênicos centrais, como c-Myc. É importante ressaltar ainda, que a inibição da sinalização das vias PI3K-AKT-mTOR e β -catenina não foi observada em células MRC5 derivadas de fibroblastos pulmonares, demonstrando assim a dependência diferencial de FASN entre as células tumorais e normais para a regulação destas vias de proliferação e sobrevivência celular. Adicionalmente a estes mecanismos, Heuer et al (2017) demonstraram que a inibição de FASN com TVB-3166 ou seu análogo TVB-3664 reduz significativamente a palmitoilação da tubulina, interferindo assim na organização dos microtúbulos e inibindo β -catenina. Mais recentemente, Jafari et al. (2018) demonstraram que a inibição de FASN mediada pelo TVB-3664 inibe significativamente a capacidade de células derivadas de câncer colorretal em proliferar, migrar, formar complexos de adesões focais e de degradar gelatina, sugerindo assim que FASN promove propriedades metastáticas no câncer colorretal por meio do aumento do metabolismo de esfingolipídios.

A eficácia *in vivo* da inibição da FASN mediada pelo TVB-3166 foi investigada em diversos modelos tumorais. O crescimento xenográfico de tumores de pâncreas (PANC-1) e ovário (OVCAR-8), bem como adenocarcinomas e carcinomas de células escamosas de pulmão no modelo PDX foi significativamente inibido pelo tratamento com TVB-3166 por via oral (Ventura et al., 2015). Os resultados deste estudo demonstraram ainda que TVB-3166 apresenta excelente biodisponibilidade oral e propriedades farmacocinéticas gerenciáveis, o que resultou em inibição dose-dependente bem tolerada da fosforilação de Akt e do crescimento de tumores com perfis genéticos variados, incluindo aqueles que expressaram o mutante K-Ras, ErbB2 e c-MET. De acordo com estes achados, os resultados do estudo de Zaytseva et al. (2018) sugerem que a ativação das vias AMPK, AKT e EKR1/2 pode ser um

mecanismo de resistência à inibição de FASN. Neste estudo, foi avaliado o efeito do TVB-3664 em modelo PDX de câncer colorretal, que resultou na redução do volume tumoral em 30% dos casos, estando este efeito associado à diminuição das vias oncogênicas AKT e EKR1/2. Adicionalmente, foram encontradas alterações significativas na composição lipídica dos tumores tratados com TVB-3664, que incluíram redução significativa de ácidos graxos e fosfolipídios e aumento de lactosilceramida e esfingomielina, especialmente em modelos PDX sensíveis à inibição de FASN. Por fim, em outro estudo, a eficácia antitumoral foi significativamente aumentada com a combinação de tratamento entre inibidor de FASN e taxano em comparação a dosagem de uma única droga. Assim, o tratamento combinado de TVB-3166 com paclitaxel causou forte inibição do crescimento tumoral em modelos xenográficos de pulmão, ovário, próstata e pâncreas, sugerindo que combinações similares podem ser úteis na terapia de neoplasias malignas humanas (Heuer et al., 2017). Vale ressaltar que estes efeitos antitumorais ocorreram sem a ativação da β -oxidação ou de outros efeitos indesejáveis.

Apesar de poucos trabalhos publicados na literatura até o momento, os inibidores da série TVB (TVB-3166, TVB-3664, TVB-3693 e TVB-3567) demonstraram alta potência e seletividade, sendo tipicamente bem tolerados em animais (Benjamin et al., 2015; Ventura et al., 2015; Heuer et al., 2017; Jafari et al., 2018; Zaytseva et al., 2018; Tao et al., 2019). Assim, o TVB-2640 foi o primeiro inibidor de atividade de FASN a ser testado clinicamente em pacientes com tumores sólidos avançados, incluindo os cânceres de mama, pulmão, colón e astrocitoma (ClinicalTrials.gov: NCT02223247). A primeira fase do ensaio clínico mostrou que o TVB-2640 possui um perfil de tolerabilidade favorável sem efeitos adversos significativos. A malonil-carnitina sérica é um biomarcador fundamental que surgiu durante este ensaio clínico, cujo aumento significativo foi observado na maioria dos pacientes após o início da monoterapia, bem como a diminuição sérica de palmitato, firmando o envolvimento de FASN com TVB-2640. Além disso, reduções significativas na fosforilação de AKT foram observadas em biópsias recolhidas de pacientes tratados com TVB-2640 (O'Farrell et al., 2015; Dean et al., 2016). Adicionalmente, quando TVB-2640 foi administrado em combinação com paclitaxel, foi observada prolongada estabilização da doença em pacientes com câncer de pulmão e mama (Brenner et al., 2016). Atualmente, TVB-2640 está sendo testado em fase II do ensaio clínico em combinação com outros agentes terapêuticos, como trastuzumab e bevacizumab, além do paclitaxel (ClinicalTrials.gov:NCT03179904). Ainda que a estrutura química do TVB-2640 não tenha sido publicada, evidências sugerem que este

composto possui similaridade química com TVB-3166, assim como outros análogos (Buckley et al., 2017).

2.5 FASN em CEC oral

Nas últimas duas décadas, diversos grupos de pesquisa têm demonstrado que alta expressão e atividade de FASN favorecem a proliferação e a sobrevivência de células malignas, sugerindo que esta enzima desempenha um papel importante na patogênese do câncer (Menendez e Lupu, 2007). Em 1999, Krontiras et al. relataram a primeira associação entre FASN e CEC oral ao demonstrarem, por meio de reações de imunoistoquímicas, a expressão de FASN em amostras de mucosa oral morfológicamente normal, com displasia epitelial e de CECs primários de língua. Neste estudo, a imunorreatividade para FASN foi maior nos CECs de língua do que no tecido epitelial displásico, que por sua vez, expressou mais FASN do que o epitélio oral normal. Em nosso laboratório, já foi demonstrado que FASN é importante para a proliferação de células derivadas de CECs orais, além de ser mais expressa em amostras de CECs orais do que no epitélio oral morfológicamente normal adjacente aos tumores (Agostini et al., 2004; Silva et al., 2008a). Silva et al. (2004) demonstraram, por meio de reações de imunoistoquímicas, que cerca de 70% dos casos de CECs de cabeça e pescoço possuem elevada positividade simultânea para FASN e ErB2, em associação com marcador de proliferação celular Ki-67. Em estudo realizado com amostras de 102 CECs de língua, aproximadamente 80% dos tumores foram positivos para FASN, o que foi significativamente correlacionado com o grau histológico, presença de permeação linfática, infiltração perineural e linfonodos metastáticos, sugerindo assim que a expressão de FASN está associada com a progressão do CEC de língua (Silva et al., 2008b). Em seguida, com estes mesmos tumores, foi observada associação entre a positividade para ErB2 na membrana celular com a presença de FASN, assim como da expressão de ErB2 citoplasmático com a de Ki-67, que foi significativamente associada a um alto risco de recorrência e menor tempo de sobrevida para os pacientes (Silva et al., 2008c). Em amostras de CEC orais microdissecadas a laser, Silva et al. (2009) observaram uma correlação positiva entre a expressão de RNAs mensageiros de FASN, ErB2, USP2a com a presença de linfonodos cervicais metastáticos. Adicionalmente, foi observada maior expressão de FASN em metástases pulmonares do que no tumor primário de origem em pacientes com CECs agressivos na região de cabeça e pescoço (Silva et al., 2010).

Trabalhos do nosso grupo de pesquisa demonstraram também, em linhagens celulares derivadas de CEC de língua, que a inibição farmacológica de FASN com cerulenina ou orlistat provoca redução da proliferação e da migração celular, induz apoptose e aumenta a produção da isoforma antiangiogênica VEGF-A_{165b} (Agostini et al., 2004, 2014; Seguin et al., 2012). Em modelo ortotópico de língua desenvolvido por Agostini et al. (2014), o orlistat reduziu significativamente o volume dos tumores primários e, principalmente, o número de linfonodos cervicais metastáticos foi reduzido em 43%. De acordo, em dados ainda não publicados, foi demonstrado em camundongos portadores de CECs ortotópicos de língua, que o orlistat reduz em 55,9% o volume dos tumores, enquanto o tratamento combinado de orlistat e paclitaxel provoca inibição de 99,6% do crescimento tumoral, quando comparado aos grupos controle. Neste mesmo estudo, o orlistat inibiu em cerca de 47% a disseminação metastática, e a associação de orlistat com paclitaxel reduziu em aproximadamente 80% destas metástases (Moreira FS, 2017).

3 PROPOSIÇÃO

3.1 Proposição geral

Avaliar os efeitos do inibidor da enzima FASN TVB-3166 nas linhagens celulares derivadas de carcinoma espinocelular de língua SCC-9 ZsGreen e SCC-9 ZsGreen LN-1A.

3.2 Proposições específicas

3.2.1 Avaliar o efeito do TVB-3166 sobre a viabilidade celular e identificar a concentração necessária para inibir o crescimento celular em 50% (IC_{50}) nas linhagens celulares SCC-9 ZsGreen e SCC-9 ZsGreen LN-1A.

3.2.2 Avaliar os efeitos do tratamento com TVB-3166 na progressão do ciclo celular e sobre as taxas de morte por apoptose ou necrose nas linhagens celulares SCC-9 ZsGreen e SCC-9 ZsGreen LN-1A.

3.2.3 Avaliar os efeitos do tratamento com TVB-3166 sobre a proliferação e migração nas células SCC-9 ZsGreen e SCC-9 ZsGreen LN-1A.

3.2.4 Avaliar os efeitos do tratamento com TVB-3166 sobre a atividade gelatinolítica das MMP-2 e MMP-9 nas linhagens celulares SCC-9 ZsGreen e SCC-9 ZsGreen LN-1A.

3.2.5 Avaliar os efeitos do tratamento com TVB-3166 sobre a adesão celular ao miogel nas linhagens celulares SCC-9 ZsGreen e SCC-9 ZsGreen LN-1A.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Cultura de células

Para a realização dos experimentos deste estudo foram utilizadas duas linhagens celulares – SCC-9 ZsGreen (SCC-9 ZsG) e SCC-9 ZsGreen LN-1A (LN-1A) – derivadas de CEC oral humano estabelecidas em nosso laboratório. Como descrito por Agostini et al. (2014) a linhagem SCC-9 ZsGreen é proveniente da transfecção da proteína verde fluorescente ZsGreen (Clontech) em células SCC-9 adquiridas da *American Type Culture Collection* (ATCC). A linhagem celular metastática LN-1A foi produzida a partir de linfonodos axilares, após a inoculação das células SCC-9 ZsGreen na pata dianteira de camundongos atímicos (Moreira FS, 2017). O cultivo de ambas as linhagens celulares foi realizado em frascos plásticos de 25 ou 75 cm² (Corning) com o meio de cultura DMEM/F-12 (Invitrogen) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, Cultilab), solução antibiótica e antimicótica (Gibco, Life TechnologiesTM) na diluição de 1:100 e 400 ng/mL de hidrocortisona (Eurofarma) a 37 °C em atmosfera contendo 5% de CO₂ e 95% de umidade.

Todos os subcultivos foram realizados até as culturas atingirem cerca de 70% de confluência, quando o meio de cultura foi removido, as células lavadas com solução salina tamponada com fosfato pH 7,4 (PBS) e depois incubadas a 37°C com aproximadamente 27 µL/cm² de tripsina a 2% (0,25% Trypsin-EDTA, Gibco, Life ThecnologiesTM) por cerca de 5 minutos. Após o desprendimento total das células da superfície do frasco de cultura, a ação da tripsina foi interrompida pela adição de um volume pelo menos três vezes maior de meio de cultura contendo 10% de SFB. A suspensão de células foi então transferida para tubos plásticos estéreis de 15 mL e centrifugados a 900 xg (centrífuga Excelsa Modelo 206 BL, FANEM) por 3 minutos. O sobrenadante foi descartado, os “pellets” de células ressuspensos em meio de cultura com 10% de SFB e 10 µL desta suspensão utilizada para contagem de células na câmara de Neubauer para a realização dos experimentos. As células também foram replaqueadas em novos frascos de cultura, sendo o meio trocado em intervalos de 48 horas para a manutenção da cultura. Para o congelamento de amostras de cada linhagem celular, as células foram suspensas em solução contendo 10% de di-metil sulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich) e 90% de SFB e 1 mL desta suspensão acondicionado em tubos criogênicos que foram estocados em freezer a -80 °C. O descongelamento das células foi realizado pela incubação dos tubos criogênicos em banho de água a 37°C e as células rapidamente

transferidas para tubos plásticos estéreis de 15 mL contendo 9 mL de meio DMEM/F-12 com 10% de SFB e depois centrifugados a 900 xg (centrífuga Excelsa Modelo 206 BL, FANEM). Os “pellets” foram então ressuspensos em meio contendo 10% FBS e as células cultivadas em novos frascos de cultura. As linhagens celulares foram subcultivadas por até no máximo dez passagens após o descongelamento e então descartadas. Periodicamente, as células foram testadas para a presença de *mycoplasma* spp. por meio de reações em cadeia da polimerase (*Polymerase chain reaction* – PCR).

4.2 Preparo da solução de TVB-3166

TVB-3166 (Sigma-Aldrich) foi diluído em DMSO para uma concentração de 5 mg/mL e separado em alíquotas, que foram armazenadas a – 20 °C protegidas da luz. Para a realização de todos os ensaios funcionais, as células dos grupos controle receberam volume de DMSO equivalente ao dos grupos das células tratadas com TVB-3166.

4.3 Análise da viabilidade celular por MTT e cálculo da IC₅₀

A viabilidade celular foi avaliada pelo método colorimétrico com 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma-Aldrich), que demonstra a atividade mitocondrial em células viáveis pela medida da formação de cristais de formazan a partir da redução do sal tetrazólio (Mosmann, 1983). Para isso, 6 x 10³ células SCC-9 ZsG e LN-1A foram ressuspensas em 300 µL de meio DMEM/F-12 suplementado com 10% de SFB e plaqueadas em cada poço de uma placa de 48 poços. Após 24 horas, o meio foi substituído por DMEM/F-12 livre de SFB, seguida de incubação por mais 24 horas para promover a sincronização das células. O meio foi então removido e concentrações crescentes de TVB-3166 diluídas em meio DMEM/F-12 suplementado com 2% de SFB foram adicionadas aos poços. Passadas 48 horas de tratamento, as células foram incubadas a 37 °C com 0,3 mg/mL de MTT diluído em meio livre de SFB por mais 4 horas. Em seguida, o meio foi removido e os cristais de formazan presentes em cada poço foram solubilizados com 250 µL de etanol absoluto (Merck). A solução foi então homogeneizada, 100 µL de cada condição experimental foram transferidos para poços de uma placa de 96 poços, e as absorbâncias mensuradas em espectrofotômetro com comprimento de onda de 595 nm, corrigidos para 655 nm (iMarkTM Microplate Absorbance Reader, BioRad). A viabilidade celular foi expressa em

porcentagem em relação aos controles, todos os experimentos foram feitos em duplicata e repetidos três vezes.

A metade da concentração inibitória (IC_{50}) foi calculada com auxílio do software CompuSyn para a realização dos experimentos em cultura. Para este estudo, em todos os ensaios funcionais, as células SCC-9 ZsG e LN-1A foram tratadas com a IC_{50} e a IC_{25} (valor que corresponde a metade da IC_{50}) do TVB-3166 referentes a cada linhagem celular.

4.4 Análise da proliferação celular

Para avaliar a proliferação celular, 8×10^3 células SCC-9 ZsG e LN-1A ressuspendidas em 500 μ L de meio DMEM/F-12 suplementado com 10% SFB foram plaqueadas em cada poço de placas de 24 poços. Após 24 horas, os poços foram lavados com PBS e o meio foi substituído por DMEM/F-12 livre de SFB e as células foram incubadas por mais 24 horas, quando então se iniciou o tratamento com doses de TVB-3166 diluídas em meio DMEM/F-12 contendo 2% de SFB. Nos períodos de 24, 48 e 72 horas após do início do tratamento, as células foram lavadas com PBS e incubadas com 100 μ L de tripsina a 2% a 37 °C, até que todas estivessem completamente separadas do fundo da placa. A tripsina foi inativada com 300 μ L de meio DMEM/F-12 suplementado com 10% de FBS, a suspensão transferida para tubos plásticos de 1,5 mL (Kasvi, Brasil), que foram centrifugados a 3.000 rpm por 3 minutos (centrífuga modelo 5430 R, Eppendorf), os “pellets” ressuspendidos em 50 μ L de meio e 10 μ L desta suspensão foram utilizados para contagem das células na câmara de Neubauer. Todas as contagens foram feitas em duplicata e os experimentos repetidos quatro vezes.

4.5 Análise do ciclo celular

A análise da distribuição das células dentre as fases do ciclo celular foi feita através da marcação do DNA com iodeto de propídeo. Para cada linhagem celular (SCC-9 ZsG e LN-1A), 3×10^5 foram cultivadas em meio DMEM/F-12 contendo 10% de SFB em frascos de 25 cm². Depois de 24 horas, foi feita lavagem com PBS e sincronização do ciclo celular em meio DMEM/F-12 livre de SFB por 24 horas. Em seguida, o meio foi substituído por DMEM/F12 suplementado com 2% de SFB contendo TVB-3166 ou somente DMSO nos

controles. Após 48 horas de tratamento, as células de cada frasco foram tripsinizadas, centrifugadas, fixadas com etanol 70% gelado a -20 °C por 12 horas, lavadas com PBS gelado e tratadas com RNase A (Sigma-Aldrich) na concentração de 10 µg/mL a 37 °C durante 1 hora. Posteriormente, as células foram incubadas com 50 µg/mL de iodeto de propídeo a 4 °C por 2 horas protegidas da incidência de luz, seguida da leitura de todas as amostras em citômetro de fluxo FACSCalibur (BD Biosciences) no canal FL2. Dez mil eventos foram analisados para cada amostra e as porcentagens de células distribuídas em cada fase do ciclo celular obtidas com auxílio do programa ModFit LTTM (Verity Software House, EUA). Os experimentos foram repetidos três vezes.

4.6 Avaliação das taxas de morte celular por apoptose e necrose

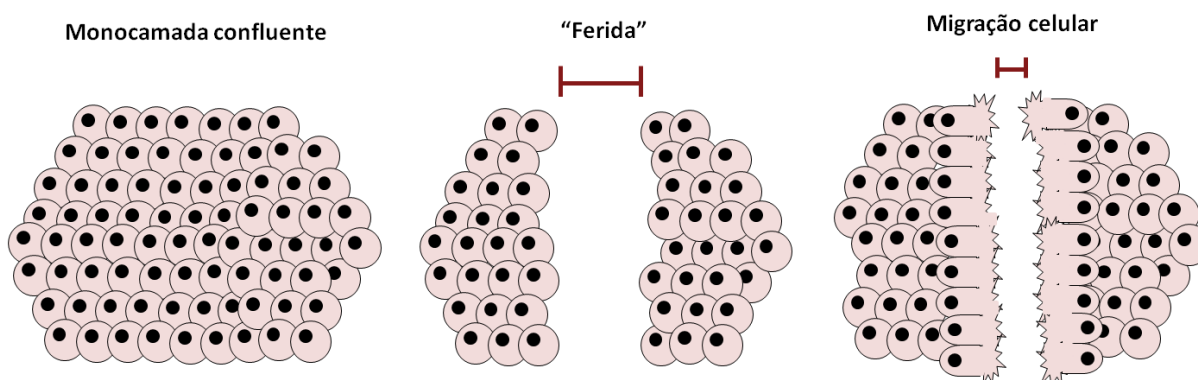
A identificação das células em processo de morte por apoptose ou necrose foi realizada por citometria de fluxo, através da marcação com Anexina V-PE e 7AA-D – PerCP (BD PharmingenTM), respectivamente. Para isso, 4×10^5 células SCC-9 ZsG e LN-1A foram plaqueadas em frascos 25 cm² em meio DMEM/F-12 com 10% SFB. Depois de 24 horas, o meio foi substituído por DMEM/F-12 sem adição de SFB por 24 horas adicionais. Após o período de sincronização, as células foram incubadas com TVB-3166 (ou DMSO nas células controle) em DMEM/F-12 suplementado com 2% de SFB durante 48 horas. Ao término do tratamento, as células foram lavadas com PBS, tripsinizadas e incubadas com 0,2 µg/µL de Anexina V-PE e 7AA-D – PerCP em tampão de ligação contendo 10 mM de HEPES pH 7,4, 150 mM de NaCl, 5 mM de KCl, 1 mM de MgCl₂ e 1,8 mM de CaCl₂ por 20 minutos protegidas da luz e à temperatura ambiente. A leitura das amostras foi realizada em citômetro de fluxo FACSCalibur (BD Biosciences) no canal FL2 e FL3 e as análises realizadas com o auxílio do programa CellQuest (Becton Dickinson). Dez mil eventos foram analisados para cada condição experimental e os experimentos repetidos três vezes.

4.7 Migração celular

O efeito do TVB-3166 sobre a migração das células SCC-9 ZsG e LN-1A foi verificado com o ensaio de migração em monocamada, utilizando o método de “scratch”. De acordo com Yarrow et al. (2004) a taxa de migração celular pode ser avaliada a partir da criação de uma área livre de células na monocamada confluenta (“ferida”), seguida da captura

de imagens em intervalos regulares, o que permite quantificar o potencial migratório dentro de um determinado período de tempo (**figura 4**). Para isso, um total de $2,4 \times 10^5$ células de ambas as linhagens celulares foram cultivadas em meio DMEM/F-12 contendo 10% SFB em cada poço de uma placa de 24 poços e incubadas a 37 °C por 18 horas para formação da monocamada confluenta. Posteriormente, as culturas foram raspadas com a ponteira estéril de 200 µL criando-se uma “ferida” e os poços lavados três vezes com PBS com posterior adição de TVB-3166 (ou com DMSO nas células controle) em meio DMEM/F-12 suplementado com 2% de SFB. As células foram incubadas por 24 horas e fotomicrografias em microscópio de contraste de fase (Nikon Eclipse Ti-S) foram realizadas nos tempos 0, 6, 12 e 24 horas. A migração celular foi analisada com auxílio do software Image J, a partir da medida da área entre as bordas da “ferida” e os valores obtidos foram normalizados em relação ao tempo 0. Foram realizadas duplicatas para cada amostra e os experimentos foram repetidos seis vezes.

Figura 4 – Esquema representativo do ensaio de migração pelo método “scratch”. Uma área livre de células é confeccionada sobre a monocamada confluenta, criando-se a “ferida”. Após a obtenção de imagens em intervalos regulares de tempo, o potencial migratório das culturas celulares é avaliado.



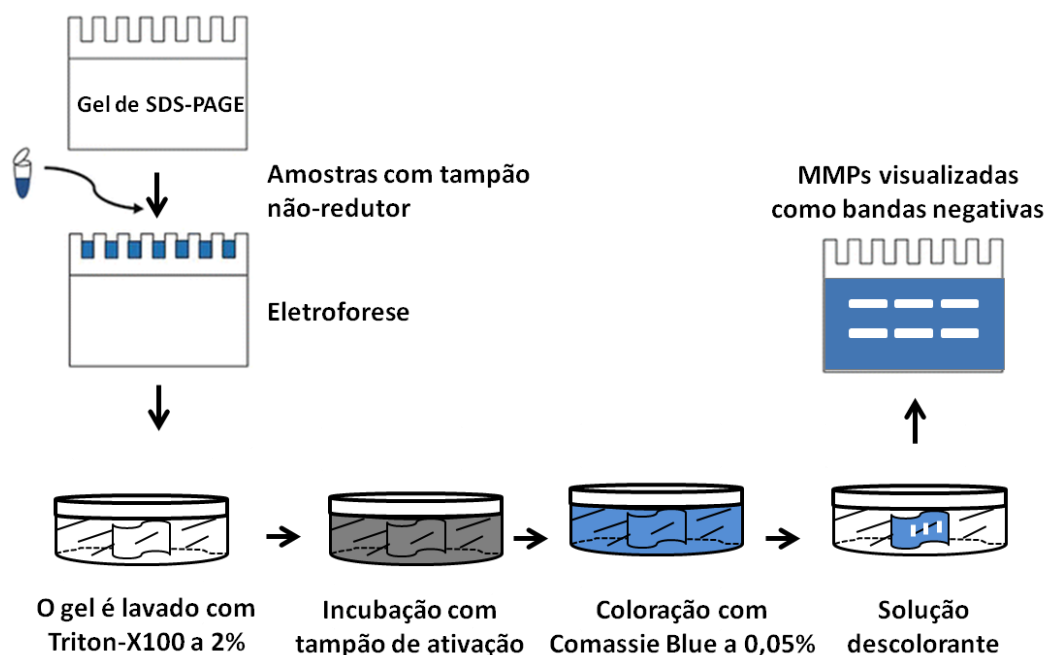
Fonte: Modificado a partir de Yarrow et al., 2004

4.8 Ensaios zimográficos

A atividade gelatinolítica de MMP-2 e MMP-9 secretadas por ambas as linhagens celulares foi determinada pelo método de zimografia (**figura 5**), que envolve a separação eletroforética das proteínas das amostras sob condições desnaturantes e não-redutoras em géis de SDS-PAGE co-polimerizados com gelatina (Heussen et al., 1980).

Para isso, 2×10^5 de células SCC-9 ZsG e LN-1A foram ressuspendidas em 1 ml de DMEM/F-12 suplementado com 10% de SFB e semeadas em poços de uma placa de 6 poços por 24 horas, seguida da substituição do meio para o DMEM/F-12 livre de SFB durante 24 horas. Após o período de sincronização, o tratamento com TVB-3166 (ou com DMSO somente nas células controle) foi realizado em meio DMEM/F-12 contendo 2% de SFB por 48 horas. Ao final deste período, o meio foi coletado e centrifugado a 3.000 rpm por 3 minutos. A seguir, alíquotas (20 μ L) de meio proveniente de cada condição experimental foi misturado com tampão de amostra não redutor contendo 2% de SDS, 125 mM de Tris-HCl pH 8,0, 10% glicerol e 0,001% azul de bromofenol. Em seguida, as amostras foram aplicadas em géis de poliacrilamida a 10% co-polimerizados com 1,6 mg/ml de gelatina (Sigma-Aldrich) e separadas por eletroforese a 20 mA por cerca de 2 horas. Em seguida, os géis foram lavados sob agitação suave a temperatura ambiente (dois banhos de 20 minutos cada) com a solução aquosa de Triton-X100 a 2% (Gibco Life Technologies BRL) para remoção do SDS e consequente renaturação das MMPs. Posteriormente, os géis foram incubados em tampão de ativação contendo 50 mM de Tris-HCl pH 7,4 e 5 mM de CaCl_2 a 37 °C por 16 horas. Os géis foram então corados com Comassie Blue R-250 a 0,05% (BioRad) durante 10 minutos, seguida da adição de solução descolorante com metanol por 40 minutos. A atividade gelatinolítica foi detectada pela visualização das bandas negativas nos zimogramas com o auxílio do aparelho transiluminador UVITEC (UVITEC Cambridge), que foram posteriormente densitometradas com auxílio do software Image J. MMP-2 e MMP-9 foram identificadas pelos seus pesos moleculares (62 e 85 kDa, respectivamente) e pela inibição de suas atividades a partir da adição de EDTA a 2 mM ao tampão de ativação. Os resultados foram normalizados pelo número de células presentes em cada condição experimental e os experimentos repetidos três vezes.

Figura 5 – Esquema representativo do ensaio de zimografia. Preparo do gel de poliacrilamida a 10% copolimerizado com gelatina, seguida da adição das amostras contendo tampão não redutor para separação das proteínas pela eletroforese a 20 mA. O gel é incubado com Triton X100 a 2% e em seguida com tampão de ativação para renaturação das MMPs. Em seguida, após coloração com Comassie Blue a 0,05%, é feita adição da solução descolorante com metanol e a atividade gelatinolítica das MMPs é visualizada por meio de bandas negativas.



Fonte: Modificado a partir de He et al., 2017

4.9 Análise da adesão celular

Para avaliar os efeitos do TVB-3166 sobre a adesão das células SCC-9 ZsG e LN-1A utilizou-se uma matriz extracelular preparada a partir de leiomiomas denominada de miogel, desenvolvida por Salo et al., 2015. O miogel é constituído por mais de setecentas proteínas dentre as quais se destacam a laminina, fibronectina, integrinas e colágenos tipos I, III, IV, XII e XIV. Desta forma, placas de 48 poços foram sensibilizadas com 10 µg/µL de miogel diluído em PBS e mantidas a 4 °C. Ao mesmo tempo, poços controle foram confeccionados para testar especificidade da adesão ao miogel, os quais foram incubados apenas com PBS. Após 24 horas, todos os poços foram lavados duas vezes com PBS e receberam solução de albumina de soro bovino (BSA, Pentex Miles, E.U.A) a 3% em PBS, que permaneceu durante 2 horas a 37 °C. Previamente à sensibilização das placas, 3×10^5 células de ambas a linhagens celulares foram cultivadas em 5 mL meio DMEM/F-12 com

10% de SFB em frascos de 25 cm² e carenciadas por mais 24 horas. Em seguida, as células foram incubadas com TVB-3166 (ou DMSO nas células controle) em DMEM/F-12 suplementado com 2% de SFB durante 48 horas. Ao término do tratamento, as células foram tripsinizadas, 8×10^4 células SCC-9 ZsG e LN-1A ressuspensas em 250 µL de meio DMEM/F-12 com 2% FBS, plaqueadas em cada poço da placa de 48 poços previamente sensibilizada e mantidas a 37 °C por até no máximo 1 hora. Após a adesão celular, os poços foram lavados três vezes com PBS, para remoção das células não aderentes, e as células que permaneceram aderidas foram então fixadas com ácido tricloroacético a 10% (TCA, Sigma-Aldrich) durante 15 minutos e coradas com cristal violeta a 0,1% (Merck) por 10 minutos. Depois, as células foram extensivamente lavadas com água destilada para remoção do excesso de corante, o que foi seguido da adição de 250 µL de etanol a 70%, que foi mantido por 10 minutos sob agitação suave a 37 °C. A solução foi então homogeneizada, 100 µL de etanol proveniente de cada condição experimental foram transferidos para poços de uma placa de 96 poços e as absorbâncias mensuradas no espectrofotômetro com comprimento de onda de 595 nm, corrigidos para 655 nm (iMarkTM Microplate Absorbance Reader, BioRad). Os experimentos foram realizados em duplicata e repetidos três vezes.

4.10 Forma de análise dos resultados

Os resultados foram realizados através da análise de variância ANOVA One-Way com o teste de comparações múltiplas de Dunnett ou o teste de comparações múltiplas de Tukey. O nível de significância estabelecido foi de 5% ($p < 0,05$). Todos os dados foram analisados com auxílio do programa GraphPad Prism, versão 5.0.

5 RESULTADOS

5.1 Efeito do TVB-3166 sobre a viabilidade das células SCC-9 ZsG e LN-1A e cálculo da IC₅₀

O efeito do TVB-3166 sobre a viabilidade das linhagens SCC-9 ZsG e LN-1A foi avaliado pelo ensaio de MTT após 48 horas de tratamento com doses crescentes da droga (10, 25, 50 e 100 μ M) em meio contendo 2% de SFB. Neste ensaio, verificou-se uma redução da viabilidade celular que ocorreu de maneira progressiva, em relação aos controles, tanto nas células SCC-9 ZsG (**gráfico 1**) quanto nas células LN-1A (**gráfico 2**). Avaliamos também o efeito do TVB-3166 sobre a viabilidade celular das mesmas células em meio suplementado com 10% de SFB e observamos que a resposta foi menor, quando comparada às células tratadas em meio contendo 2% SFB, com uma redução na sensibilidade que variou de 5% a 20% de acordo com a concentração da droga utilizada (dados não mostrados). Por esta razão, utilizamos em todos os experimentos seguintes o tratamento com TVB-3166 em meio suplementado com 2% SFB.

Gráfico 1 - O tratamento com TVB-3166 reduziu a viabilidade das células SCC-9 ZsG de maneira progressiva. As células SCC-9 ZsG foram tratadas com doses crescentes de TVB-3166 por 48 horas e a viabilidade determinada pelo método de MTT. O gráfico representa a média de três experimentos independentes. C: controle; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Anova One-way com teste de Dunnet.

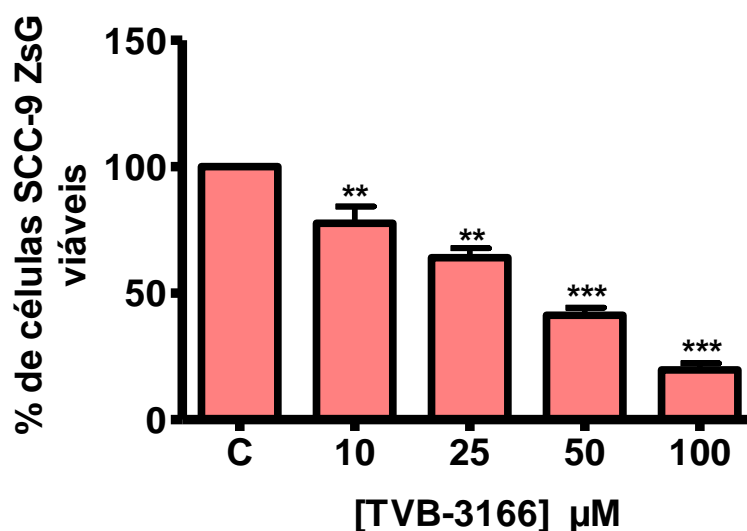
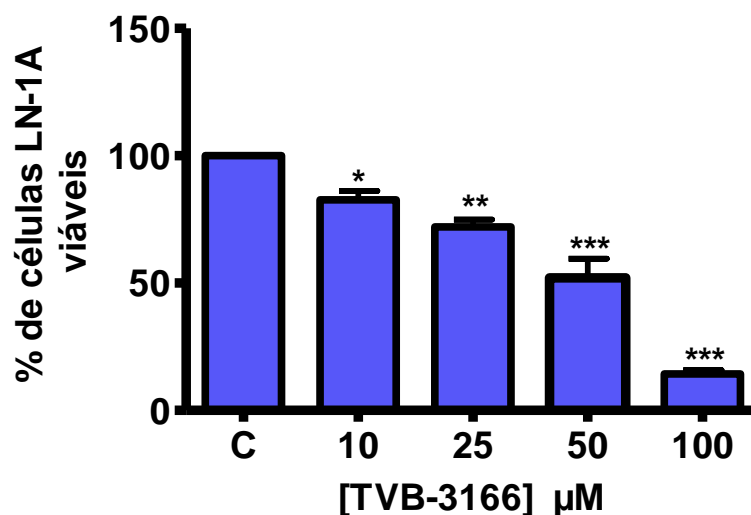


Gráfico 2 - O tratamento com TVB-3166 reduziu a viabilidade das células LN-1A de maneira progressiva. As células LN-1A foram tratadas com doses crescentes de TVB-3166 por 48 horas e a viabilidade determinada pelo método de MTT. O gráfico representa a média de três experimentos independentes. C: controle; * $p<0,05$; ** $p<0,01$, *** $p<0,001$. Anova One-way com teste de Dunnet.



Neste estudo, ambas as linhagens celulares foram submetidas a diferentes concentrações do TVB-3166, com o objetivo de determinar a concentração que provoque a morte significativa de 50% do total das células. Esta concentração é a chamada de IC_{50} . Desta forma, quanto menor o valor da IC_{50} mais sensíveis são as células ao tratamento recebido. Em nosso trabalho, o cálculo da IC_{50} foi realizado com auxílio do software CompuSyn, a partir dos valores gerados pelas absorbâncias dos ensaios de MTT. Nossos resultados revelaram os valores da IC_{50} de 30 μM para a SCC-9 ZsG e de 37 μM para a LN-1A (**gráficos 3 e 4**, respectivamente), evidenciando que as células SCC-9 ZsG foram discretamente mais sensíveis ao TVB-3166 do que as da linhagem metastática LN-1A no tratamento por 48 horas. A IC_{25} é, portanto, 15 μM e 18,5 μM para as células SCC-9 ZsG e LN-1A, respectivamente. Os valores aqui descritos para a IC_{50} e IC_{25} de cada linhagem celular foram utilizados para todos os experimentos subsequentes realizados desta pesquisa.

Gráfico 3 – Cálculo da IC_{50} do TVB-3166, em gráfico gerado pelo software CompuSyn, destacando o valor obtido de 30 μM nas células SCC-9 ZsG, após 48 horas de tratamento. Representação dos mesmos três experimentos mostrados no gráfico 1.

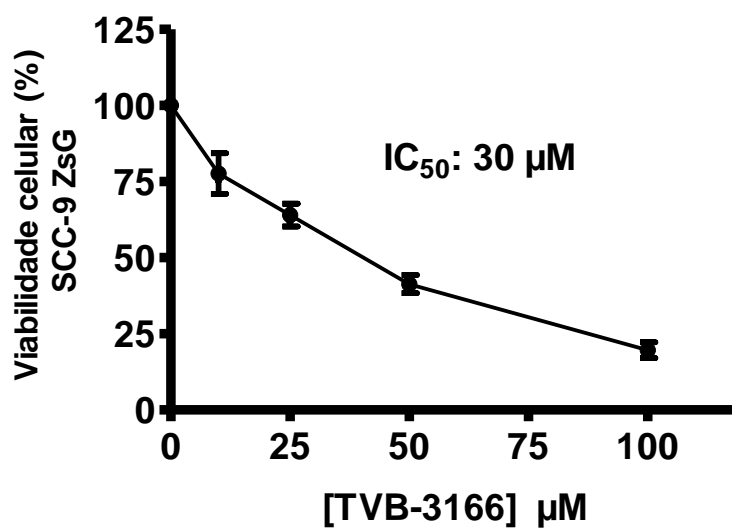
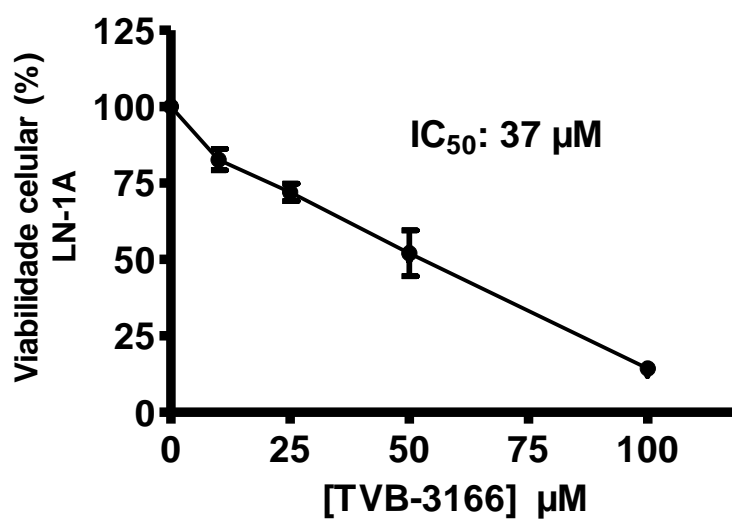


Gráfico 4 – O cálculo da IC_{50} do TVB-3166, em gráfico gerado pelo software CompuSyn, destacando o valor de 37 μM nas células LN-1A, após 48 horas de tratamento. Representação dos mesmos três experimentos mostrados no gráfico 2.



5.2 Alterações morfológicas induzidas pelo tratamento com TVB-3166 nas células SCC-9 ZsG e LN-1A

A morfologia das células SCC-9 ZsG e LN-1A, submetidas ou não ao tratamento com TVB-3166, foram observadas e fotografadas em microscópio de contraste de fase. Para melhor visualização dos efeitos da exposição ao TVB-3166, as imagens foram obtidas nos aumentos de 40 e 100 vezes. A linhagem celular SCC-9 ZsG é composta por células predominantemente poliédricas, com núcleos grandes e nucléolos evidentes, com um fenótipo compatível com o de células epiteliais (**figuras 6 A e D**). Entretanto, a linhagem metastática LN-1A apresenta morfologia mais heterogênea, sendo composta por células poliédricas e, em menor número, células tipicamente fusiformes, como pode ser observado nas **figuras 7 A e D**. Após 48 horas de tratamento com a IC_{25} e a IC_{50} do TVB-3166, as células SCC-9 ZsG apresentaram-se mais fusiformes, com a presença de prolongamentos citoplasmáticos e nítido aumento dos espaços intercelulares (**figuras 6 B, C, E e F**). Alterações morfológicas semelhantes puderam ser observadas nas células LN-1A, que se tornaram mais fusiformes na presença da droga do que na condição controle, como evidenciado nas **figuras 7 B, C, E e F**. Em ambas as linhagens celulares, as alterações na morfologia foram semelhantes tanto no tratamento com a IC_{25} como na IC_{50} .

Figura 6 – Fotomicrografias obtidas em microscópio de contraste de fase demonstrando as alterações morfológicas (setas) ocorridas nas células SCC-9 ZsG após o tratamento com TVB-3166 pelo período de 48 horas. Imagens em aumento de 40x (A – controle; B – IC₂₅ e C – IC₅₀), e em o aumento de 100x (D – controle; E – IC₂₅ e F– IC₅₀).

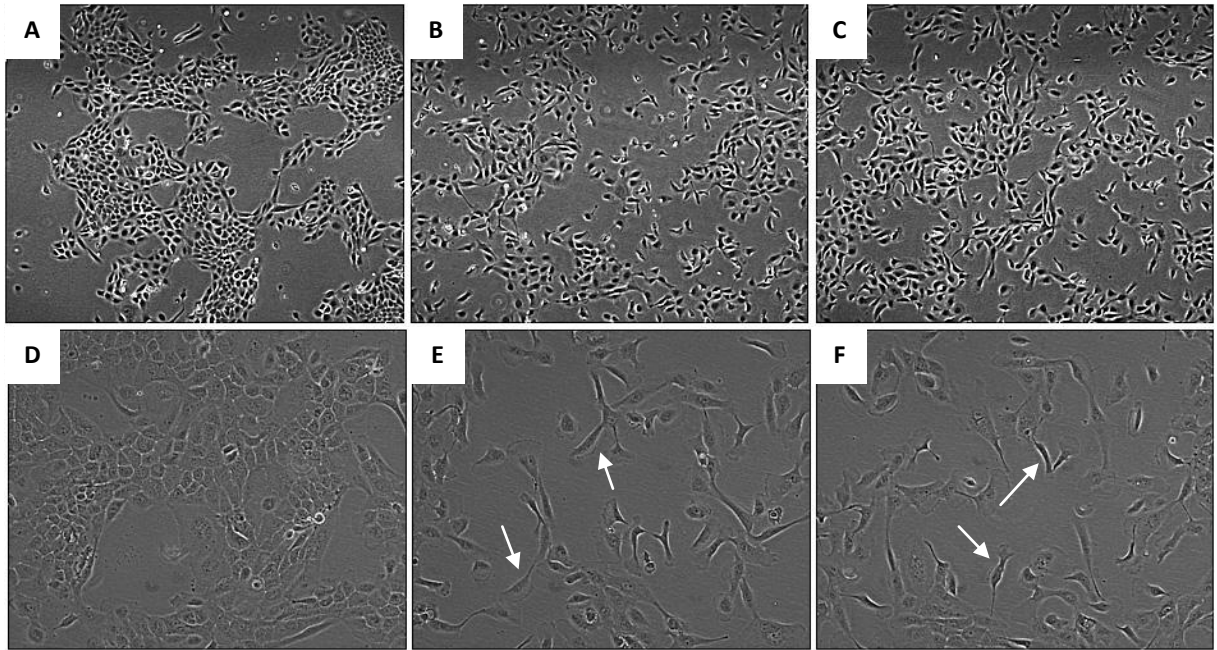
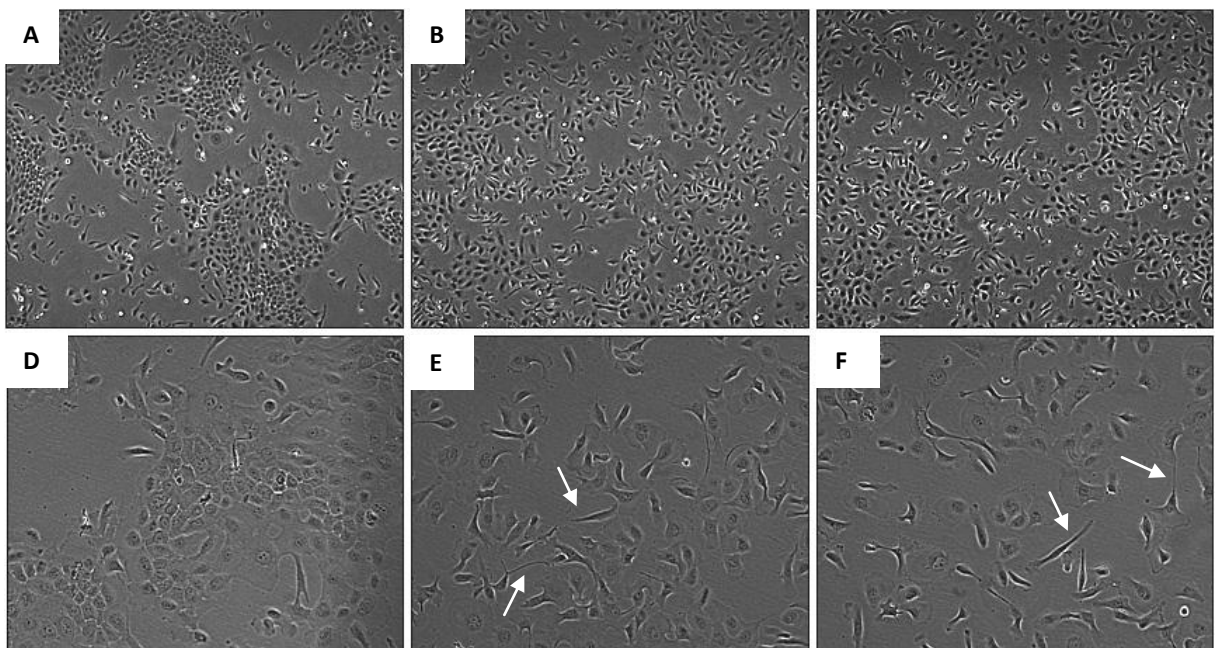


Figura 7 – Fotomicrografias obtidas em microscópio de contraste de fase demonstrando alterações morfológicas (setas) ocorridas nas células LN-1A após o tratamento com TVB-3166 pelo período de 48 horas. Imagens em aumento de 40x (A – controle; B – IC₂₅ e C – IC₅₀) e em aumento de 100x (D – controle; E – IC₂₅ e F– IC₅₀).



5.3 Efeito do TVB-3166 sobre a proliferação das células SCC-9 ZsG e LN-1A

Para observar os efeitos do TVB-3166 sobre o número de células SCC-9 ZsG e LN-1A aderidas aos poços das placas de cultura, foi realizado o tratamento pelos períodos de 24, 48 e 72 horas. A taxa de proliferação celular foi investigada pela contagem do número de células na câmara de Neubauer e os resultados normalizados pelo controle, em cada período de tempo.

Nas células SCC-9 ZsG, o tratamento com TVB-3166 reduziu significativamente o número de células aderidas aos poços nos três tempos avaliados ($p=0,0192$ relativo a 24 horas; $p=0,0048$ relativo a 48 horas e $p=0,0001$ relativo a 72 horas). No entanto, a redução da proliferação celular foi mais evidente após 72 horas de tratamento. Apesar da IC_{25} provocar uma redução discretamente maior do número de células, não houve uma diferença estatisticamente significativa em relação a IC_{50} nesta linhagem celular (**gráfico 5**). Nas células LN-1A, o tratamento com TVB-3166 reduziu a proliferação celular, quando comparado aos controles, nos três períodos avaliados. Entretanto, somente a concentração da IC_{25} no tempo de 24 horas apresentou uma redução no número de células estatisticamente significativa ($p=0,0479$). Nos demais períodos, a redução da proliferação celular não apresentou significância estatística ($p=0,1112$ relativo a 48 horas e $p=0,1788$ relativo a 72 horas), como observado no **gráfico 6**.

Gráfico 5 – TVB-3166 reduziu a proliferação das células SCC-9 ZsG após 24, 48 e 72 horas de tratamento. As células foram contadas na câmara de Neubauer e o seu número normalizado pelo controle, em cada período de tempo avaliado. O gráfico representa a média de quatro experimentos independentes. C: controle; * $p<0,05$; ** $p<0,01$, *** $p<0,001$. Anova One-way com teste de Tukey.

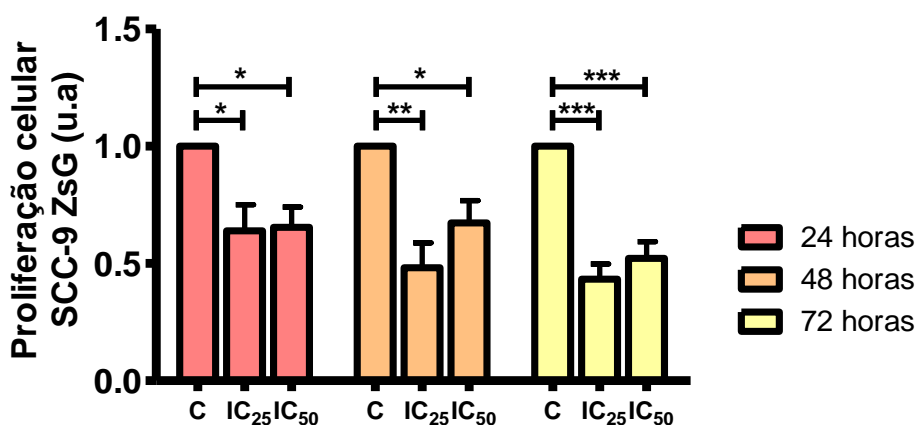
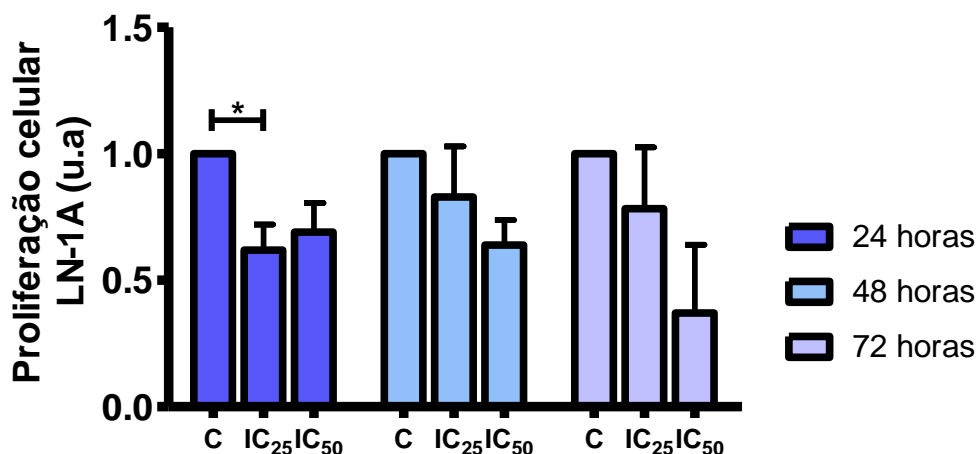


Gráfico 6 – TVB-3166 reduziu a proliferação das células LN-1A após 24, 48 e 72 horas de tratamento. As células foram contadas na câmara de Neubauer e o seu número normalizado pelo controle, em cada período de tempo avaliado. O gráfico representa a média de quatro experimentos independentes. C: controle; * $p < 0,05$. Anova One-way com teste de Tukey.



5.4 Efeito do TVB-3166 sobre a distribuição das células SCC-9 ZsG e LN-1A nas fases do ciclo celular

O efeito do TVB-3166 sobre a progressão do ciclo celular nas células SCC-9 ZsG e LN-1A foi avaliado após 48 horas de tratamento. Para isto, as células foram marcadas com iodeto de propídeo, que é um corante que se liga ao DNA, e a porcentagem de células presentes em cada fase do ciclo celular estimada por meio de citometria de fluxo.

Na linhagem SCC-9 ZsG, o tratamento resultou em aumento do número de células nas fases G0/G1 e redução significativa da quantidade de células na fase S do ciclo celular. Estes efeitos foram maiores na IC₅₀ do que na IC₂₅ do TVB-3166 em comparação com as células controle. A IC₅₀ provocou um aumento de 40,09% e a IC₂₅ de 31,38% ($p < 0,0001$) na quantidade de células em G0/G1. Concomitantemente, a redução na fase S foi de 58,55% para a IC₂₅ e de 73,74% para a IC₅₀ ($p < 0,0001$). Nas fases G2/M não foram observadas alterações significativas, como pode ser observado no **gráfico 7**. Resultados similares foram observados na linhagem metastática LN-1A, na qual o tratamento provocou acúmulo de células na fase

G0/G1, redução considerável no número de células na fase S e não modificou as fases G2/M (gráfico 8). Quando comparado aos controles, o tratamento com a IC₂₅ e a IC₅₀ de TVB-3166 aumentou em 39,4% e 46,1%, respectivamente, a quantidade de células nas fases G0/G1 ($p=0,0017$). Na fase S, a redução foi de 48,99% para a IC₂₅ e de 57,34% para a IC₅₀ ($p=0,0017$). Não houve diferenças estatisticamente significantes entre os efeitos da IC₅₀ e da IC₂₅ nas duas linhagens estudadas.

Gráfico 7 – Distribuição das células SCC-9 ZsG nas fases do ciclo celular. TVB-3166 aumentou o número de células nas fases G0/G1 e reduziu o número de células na fase S, após 48 horas de tratamento. O gráfico representa a média de três experimentos independentes. C: controle; *** e ### $p < 0,001$ tratamentos em comparação ao controle. Anova One-way com teste de Tukey.

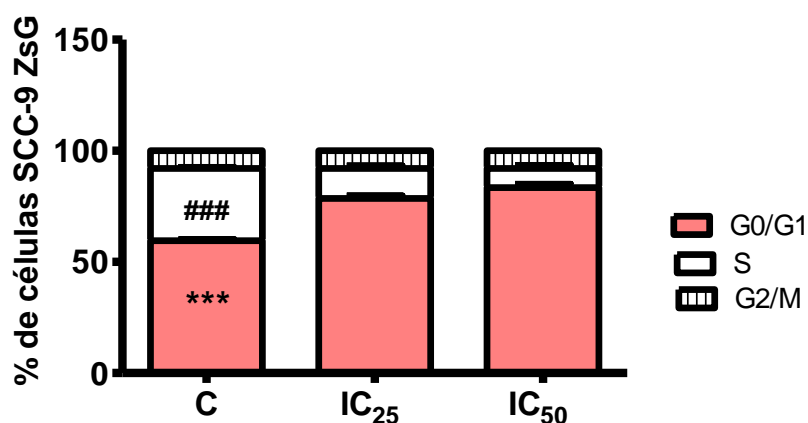
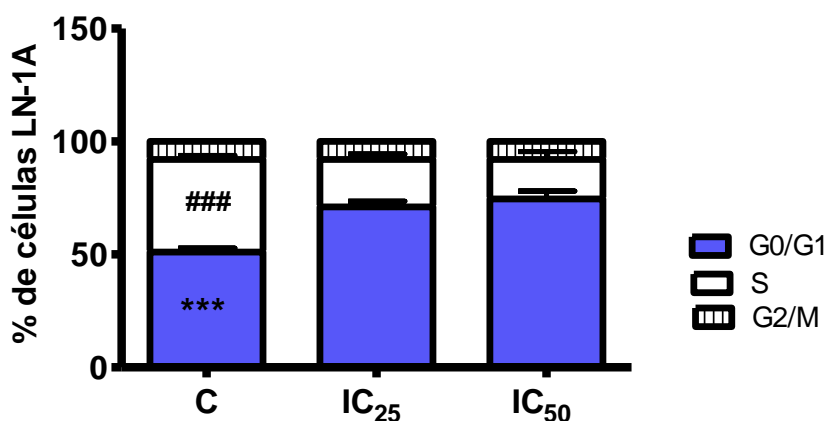


Gráfico 8 – Distribuição das células LN-1A nas fases do ciclo celular. TVB-3166 aumentou o número de células nas fases G0/G1 e reduziu o número de células na fase S após 48 horas de tratamento. O gráfico representa a média de três experimentos independentes. C: controle; *** e ### $p < 0,001$ tratamentos em comparação ao controle. Anova One-way com teste de Tukey.



5.5 Efeito do TVB-3166 sobre as taxas de morte celular por apoptose e necrose nas células SCC-9 ZsG e LN-1A

As taxas de morte celular nas células SCC-9 ZsG e LN-1A foram avaliadas por citometria de fluxo, após 48 horas de tratamento com TVB-3166. Para isto, consideramos separadamente as células marcadas somente para anexina V-PE, o que caracteriza os estágios iniciais da morte por apoptose, e as células em estágio tardio, marcadas simultaneamente com anexina V-PE e 7AA-D – PerCP. A quantidade de células em processo de morte por necrose foi determinada pela positividade para 7AA-D – PerCP.

O tratamento com TVB-3166 foi capaz de aumentar as taxas de morte celular nas duas linhagens celulares aqui estudadas. Nas células SCC-9 ZsG, a quantidade de células em estágio precoce e tardio de apoptose foi aumentada após o tratamento (**gráfico 9 A e B**, respectivamente), no entanto, apenas na IC₂₅ o resultado foi estatisticamente significativo sobre o estágio tardio de apoptose ($p=0,0276$). Quando consideramos a marcação de todas as células SCC-9 ZsG para anexina V-PE (**gráfico 9 C**), observamos que a taxa de apoptose das células tratadas com a IC₂₅ foi 1,8 vezes maior do que o controle ($p=0,0419$). Com relação à necrose, tanto a IC₂₅ como a IC₅₀ promoveram um aumento de cerca de duas vezes em relação aos controles ($p=0,0141$), como pode ser visto no **gráfico 9 D**. Por outro lado, nas células LN-1A, o tratamento resultou em uma taxa de apoptose precoce superior ao do controle (**gráfico 10 A**), porém não estatisticamente significativa ($p=0,1550$). Quando avaliamos as células duplamente marcadas (**gráfico 10 B**), a IC₂₅ e a IC₅₀ aumentaram significativamente as células em processo tardio de apoptose, sendo este efeito mais evidente na IC₅₀ ($p=0,0023$). Conforme demonstrado no **gráfico 10 C**, a IC₅₀ provocou um aumento na taxa de apoptose em cerca de duas vezes, quando comparado ao controle ($p=0,0031$). Com relação à necrose, houve aumento tanto na IC₂₅ como na IC₅₀ em relação ao controle, porém não significativo do ponto de vista estatístico ($p=0,1447$), como pode ser observado no gráfico **10 D**.

Gráfico 9 – As taxas de morte celular nas células SCC-9 ZsG foram aumentadas após 48 horas de tratamento com TVB-3166. **A** – A IC_{25} e a IC_{50} provocaram um aumento da taxa de apoptose precoce (células marcadas apenas com anexina V-PE) em relação ao controle, porém sem significância estatística ($p= 0,1700$). **B** – O tratamento aumentou a quantidade de células em processo tardio de apoptose (marcadas com anexina V-PE e 7AD-D – PerCP) quando comparadas às células controle. **C** – A taxa de apoptose total, considerando-se em conjunto apoptose precoce e tardia (todas as células marcadas com anexina V-PE), foi superior à das células controle e estatisticamente significativa na IC_{25} . **D** – A IC_{25} e a IC_{50} de TVB-3166 aumentaram a porcentagem de células em necrose (marcadas com 7AA-D – PerCP) em relação às células controle. Os gráficos representam a média de três experimentos independentes. C: controle; * $p< 0,05$. Anova One-way com teste de Tukey.

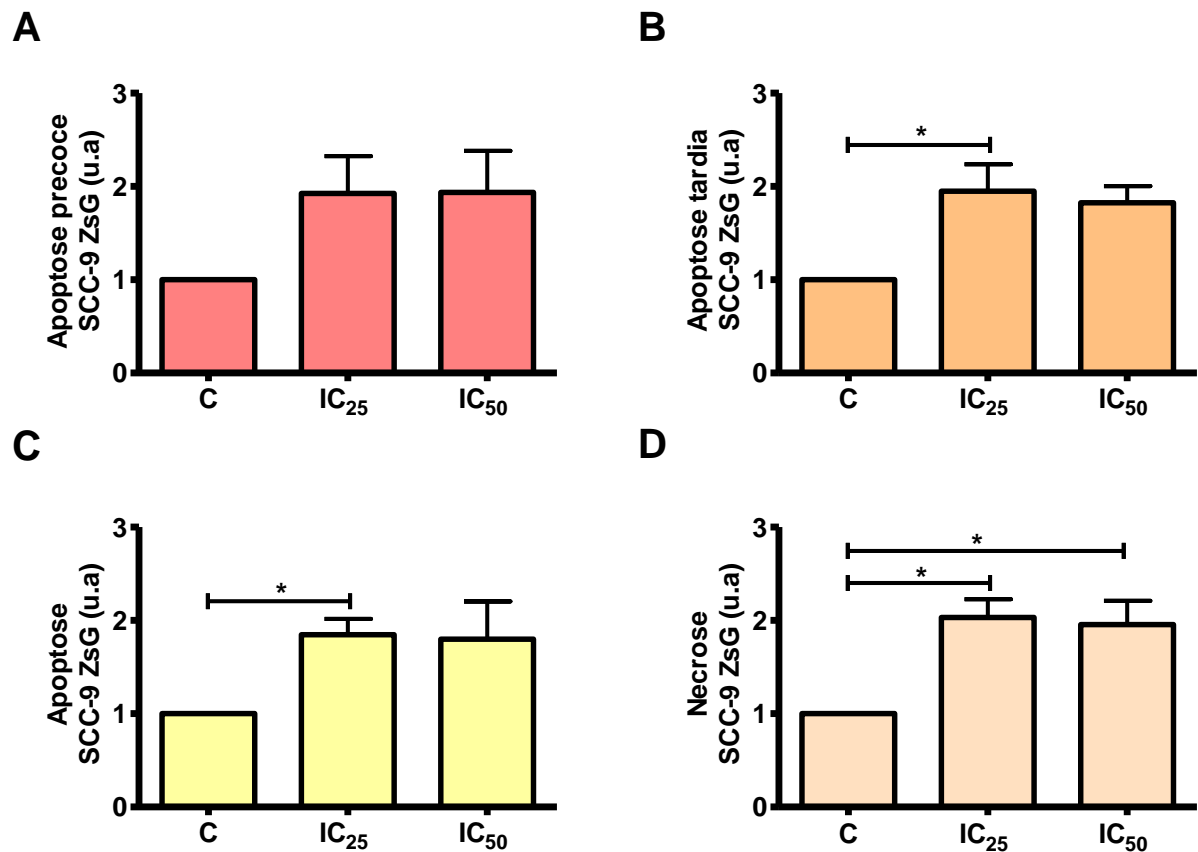
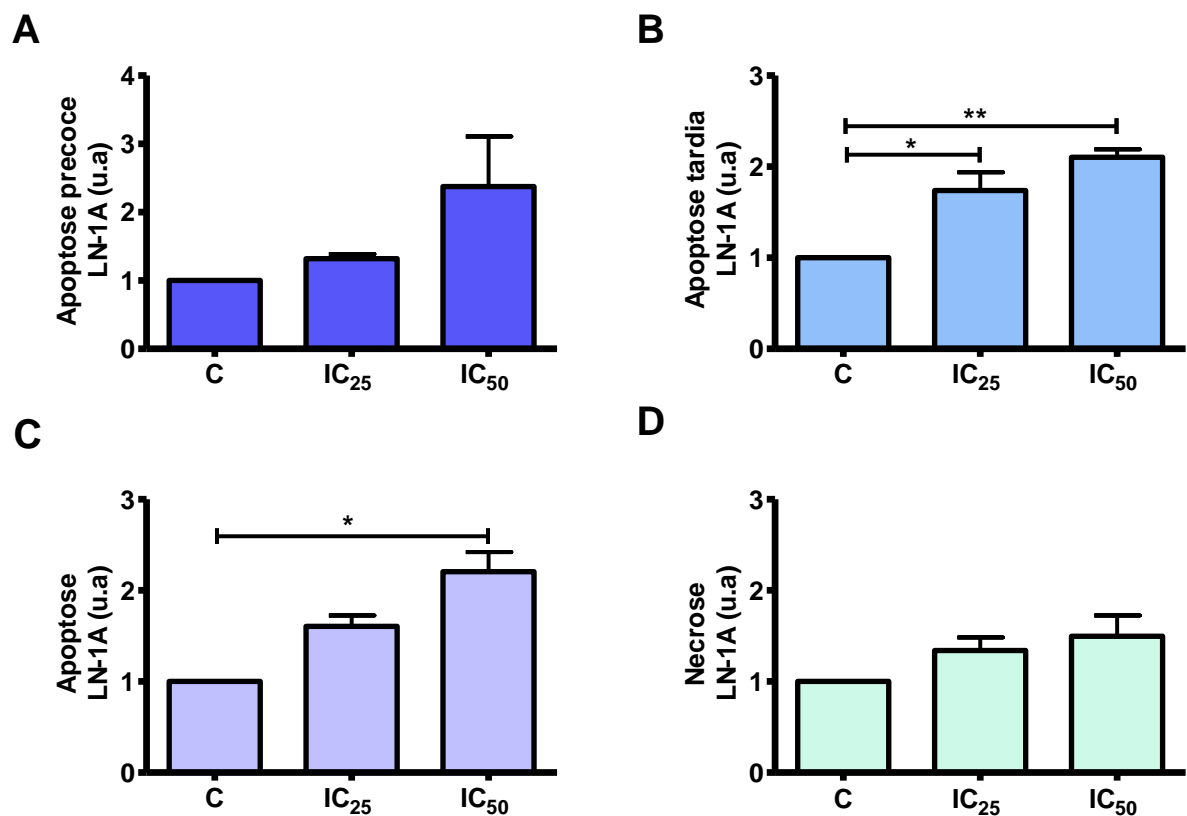


Gráfico 10 – As taxas de morte celular nas células LN-1A foram aumentadas após 48 horas de tratamento com TVB-3166. **A** – O tratamento aumentou a taxa de apoptose precoce (células marcadas apenas com anexina V-PE), porém sem significância estatística ($p=0,1550$). **B** – A IC_{25} e a IC_{50} aumentaram a quantidade de células em processo tardio de apoptose (marcadas com anexina V-PE e 7AD-D – PerCP) quando comparadas às células controle. **C** – A taxa de apoptose total, considerando-se em conjunto apoptose precoce e tardia (todas as células marcadas com anexina V-PE), foi superior à das células controle e estatisticamente significativa na IC_{50} ($p=0,0031$). **D** – O tratamento com TVB-3166 aumentou a taxa de células em necrose (marcadas com 7AA-D – PerCP) em relação às células controle, porém sem significância estatística ($p=0,1447$). Os gráficos representam a média de três experimentos independentes. C: controle; * $p<0,05$; ** $p<0,01$. Anova One-way com teste de Tukey.



5.6 Efeito do TVB-3166 sobre a migração das células SCC-9 ZsG e LN-1A

Com o objetivo de verificar o efeito do TVB-3166 sobre o potencial migratório das células SCC-9 ZsG e LN-1A, realizamos ensaios de migração em monocamada, de acordo com o protocolo descrito no item 4.7 desta dissertação. Vale aqui ressaltar que a migração celular foi determinada pela medida da área entre as bordas da “ferida” e os valores obtidos foram comparados ao tempo 0 e normalizados pelos controles nos períodos de tempo avaliados. De modo geral, os tratamentos foram capazes de reduzir a migração das células SCC-9 ZsG nos três períodos de tempo analisados, entretanto, na linhagem metastática LN-1A, esta redução ocorreu somente no período de 12 horas.

A **figura 8** e o **gráfico 11** demonstram o comportamento migratório das células SCC-9 ZsG frente ao tratamento com TVB-3166. Nesta linhagem, após 6 horas de tratamento, tanto a IC_{25} como a IC_{50} foram capazes de reduzir (em 39% e 32%, respectivamente) a área de migração celular, no entanto, apenas a IC_{25} apresentou significância estatística ($p=0,0155$). Em 12 horas, pudemos observar que a redução da migração foi mais efetiva, e tanto a IC_{25} quanto a IC_{50} provocaram uma diminuição da área de migração de 43% em relação ao controle ($p=0,0090$). Por fim, após 24 horas, a IC_{50} reduziu a migração celular em 38% em comparação às células controle ($p=0,0096$). Em contrapartida, nas células LN-1A (**figura 9** e **gráfico 12**), o tratamento com TVB-3166 causou uma discreta diminuição da área de migração após 6 horas (aproximadamente 15%, $p=0,2557$). Em 12 horas, a IC_{50} provocou uma redução de 24% da área de migração ($p=0,0090$), entretanto, após 24 horas, o tratamento reduziu a migração celular em menos de 10% em relação às células controle ($p=0,1500$).

Figura 8 – Fotomicrografias representativas do ensaio de migração em monocamada realizado com as células SCC-9 ZsG, obtidas nos períodos de 0, 6, 12 e 24 horas após a exposição ao TVB-3166. Observa-se que em todos os períodos avaliados, o TVB-3166 reduziu a área de migração das células em relação aos controles. C: controle; microscopia de contraste de fase, aumento original de 40x.

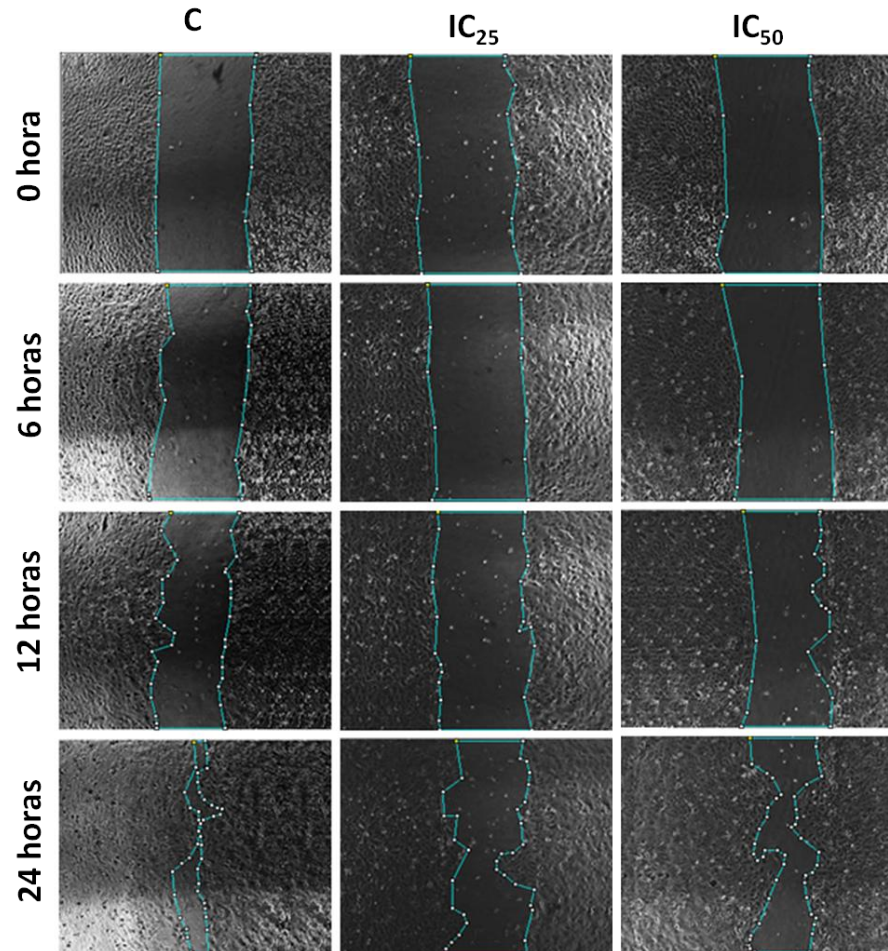


Gráfico 11 – A migração das células SCC-9 ZsG foi reduzida pelo tratamento com TVB-3166. A área entre as bordas da “ferida” foi calculada utilizando-se as imagens obtidas nos períodos de 0, 6, 12 e 24 horas. Observa-se que nos três períodos de tempo avaliados, TVB-3166 reduziu área de migração celular em relação ao controle. Os gráficos representam a média de seis experimentos independentes. C: controle; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Anova One-way com teste de Tukey.

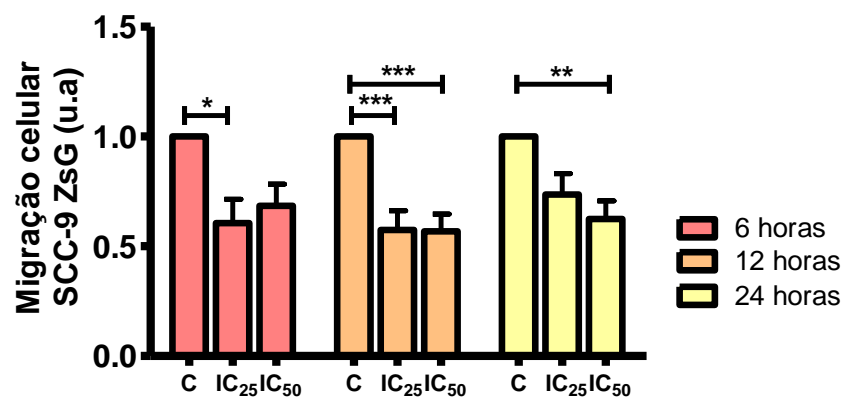


Figura 9 – Fotomicrografias representativas do ensaio de migração em monocamada realizado com as células LN-1A, obtidas nos períodos de 0, 6, 12 e 24 horas após o tratamento com TVB-3166. O tratamento provocou uma diminuição discreta no potencial migratório em relação aos controles, que foi maior no período de 12 horas. C: controle; microscopia de contraste de fase, aumento original de 40x.

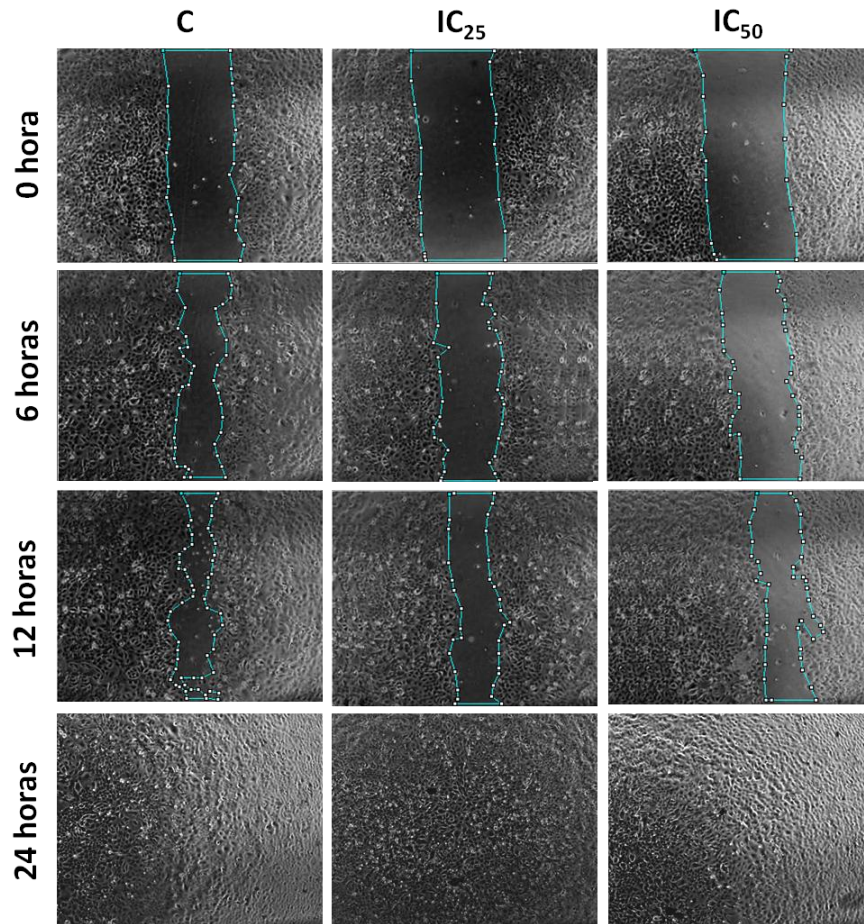
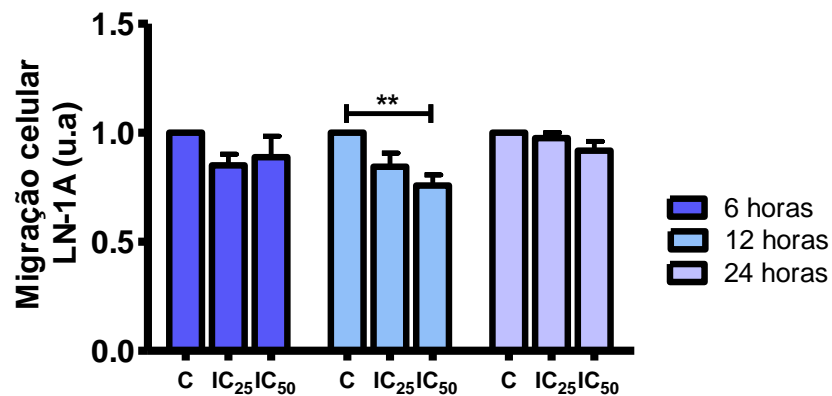


Gráfico 12 – Efeito do tratamento com TVB-3166 sobre a migração das células LN-1A. A migração celular foi determinada a partir do cálculo da área entre as bordas da “ferida” nas imagens obtidas nos períodos de 0, 6, 12 e 24 horas. TVB-3166 provocou uma discreta redução da migração, que foi significativa do ponto de vista estatístico somente no período de 12 horas, em relação ao controle. Os gráficos representam a média de seis experimentos independentes. C: controle; ** $p < 0,01$. Anova One-way com teste de Tukey.



Vale ressaltar aqui que a capacidade de migração foi maior na linhagem metastática LN-1A do que SCC-9 ZsG, que em todos os experimentos promoveu o fechamento completo das “feridas”, enquanto que a SCC-9 ZsG ocupou aproximadamente 70% do espaço após 24 horas. Também foi possível afirmar que não houve proliferação celular a ponto de interferir no fechamento da ferida, pois sabemos que ambas as linhagens celulares possuem um ciclo celular de 24 horas. Além disso, como já descrito no presente trabalho, TVB-3166 inibe a proliferação destas células em 24 horas de tratamento.

5.7 Efeito do TVB-3166 sobre a atividade gelatinolítica das MMPs -2 e -9 secretadas pelas células SCC-9 ZsG e LN-1A

Com o intuito de verificar se o TVB-3166 modula a atividade de MMPs produzidas pelas células SCC-9 ZsG e LN-1A, estas foram tratadas por 48 horas e o meio de cultura coletado para a realização dos zimogramas, como descrito na metodologia do item 4.8.

Os ensaios zimográficos realizados nas células SCC-9 ZsG e LN-1A estão representados na **figura 10 A**. A partir da observação direta das bandas negativas correspondentes as áreas de degradação da gelatina incorporada nos géis, verifica-se que o TVB-3166 não alterou a atividade enzimática das MMPs -2 e -9 nas linhagens celulares estudadas. Para confirmar a especificidade dos nossos ensaios, os géis também foram incubados na presença de um inibidor de metaloproteinases (EDTA), como mostrado na **figura 10 B**. Após a aquisição das imagens dos ensaios zimográficos, as bandas obtidas foram densitometradas e normalizadas pelo número de células presentes em cada condição experimental. Como observado nos gráficos **13 A e B**, no meio de cultura condicionado pelas células SCC-9 ZsG, as IC_{25} e IC_{50} do TVB-3166 provocaram um discreto aumento da atividade das MMPs -2 e -9, porém sem significância estatística ($p=0,3693$ e $p=0,5576$, respectivamente). Entretanto, após a normalização dos resultados, obtivemos significância estatística nas atividades das MMPs -2 e -9 ($p=0,0004$ e $p=0,0034$, respectivamente), conforme demonstrado nos **gráficos 13 C e D**. No entanto, esta diferença deve-se ao fato de que TVB-3166 possui efeito citotóxico e antiproliferativo e que o período experimental é relativamente curto e permite o acúmulo destas enzimas no meio de cultura. Nas células LN-1A (**gráficos 14 A e B**), a análise densitométrica mostrou que não houve modificação da atividade das MMPs -2 e -9 ($p=0,7862$ e $p=0,4603$, respectivamente). Como ocorreu com as células SCC-9 ZsG, após a normalização dos resultados, observamos que o tratamento

aumenta a atividade das MMPs -2 e -9 em relação aos controles (**gráfico 14 C e D**), porém de maneira não estatisticamente significativa ($p=0,0651$ e $p=0,1110$, respectivamente).

Figura 10 – Efeito do TVB-3166 sobre a atividade gelatinolítica das MMPs -2 e -9 nas células SCC-9 ZsG e LN-1A. **A** – Imagens dos géis de zimografia realizados de maneira independente com meio condicionado por ambas as linhagens celulares, após 48 horas de tratamento com TVB-3166. Pode-se observar que a atividade das MMPs -2 e -9 não foi alterada pelo TVB-3166. **B** – A atividade destas MMPs foi inibida após a incubação dos géis com EDTA a 2 mM. C: controle; Exp: experimento; imagens obtidas por meio de aparelho transiluminador (UVITEC,Cambrigde).

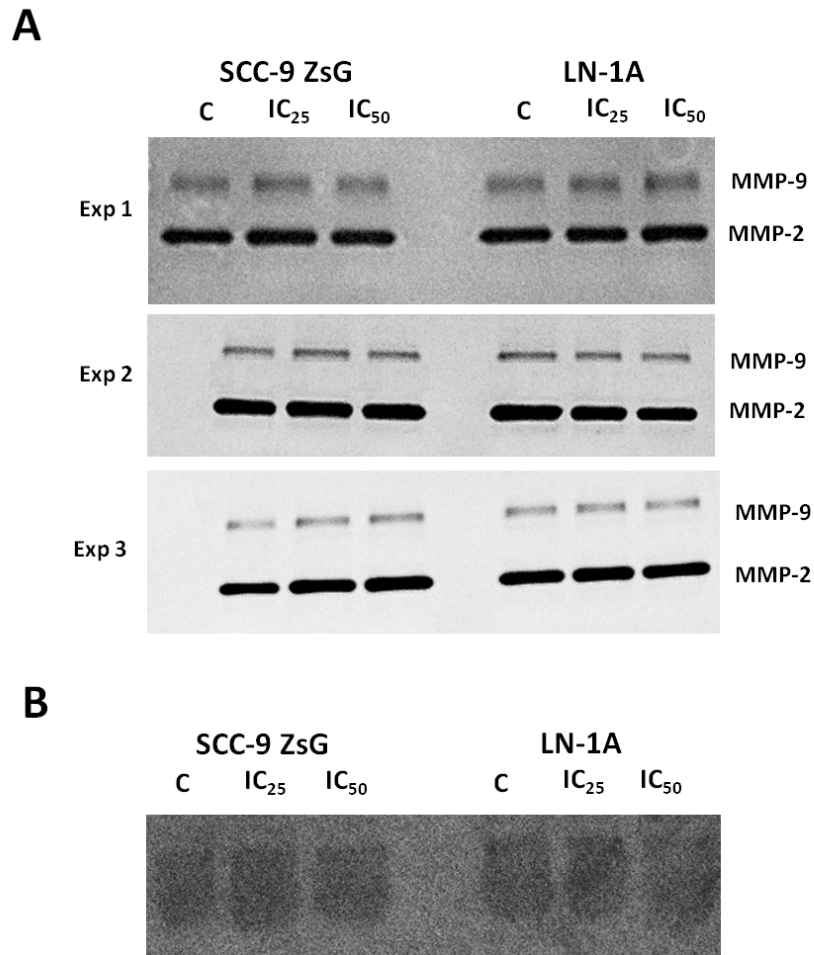


Gráfico 13 – Representação gráfica dos resultados da análise densitométrica do efeito do tratamento com TVB-3166 sobre a atividade gelatinolítica das MMPs -2 e -9 nas células SCC-9 ZsG, após 48 horas de tratamento. **A** – A atividade da MMP-9 é discretamente aumentada pelo tratamento, mas sem significância estatística. **B** – A atividade da MMP-2 também se mostra um pouco maior nas células tratadas, em relação às células controle, porém não há diferença estatisticamente significativa. **C** – As IC_{25} e IC_{50} do TVB-3166 passam a sugerir aumento da atividade da MMP-9, em relação ao controle, após normalização dos resultados pelo número de células remanescentes. **D** – A atividade da MMP-2 também se mostra aumentada pelos tratamentos após a normalização dos resultados como descrito em C. Os gráficos representam a média de três experimentos independentes. C: controle; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Anova One-way com teste de Tukey.

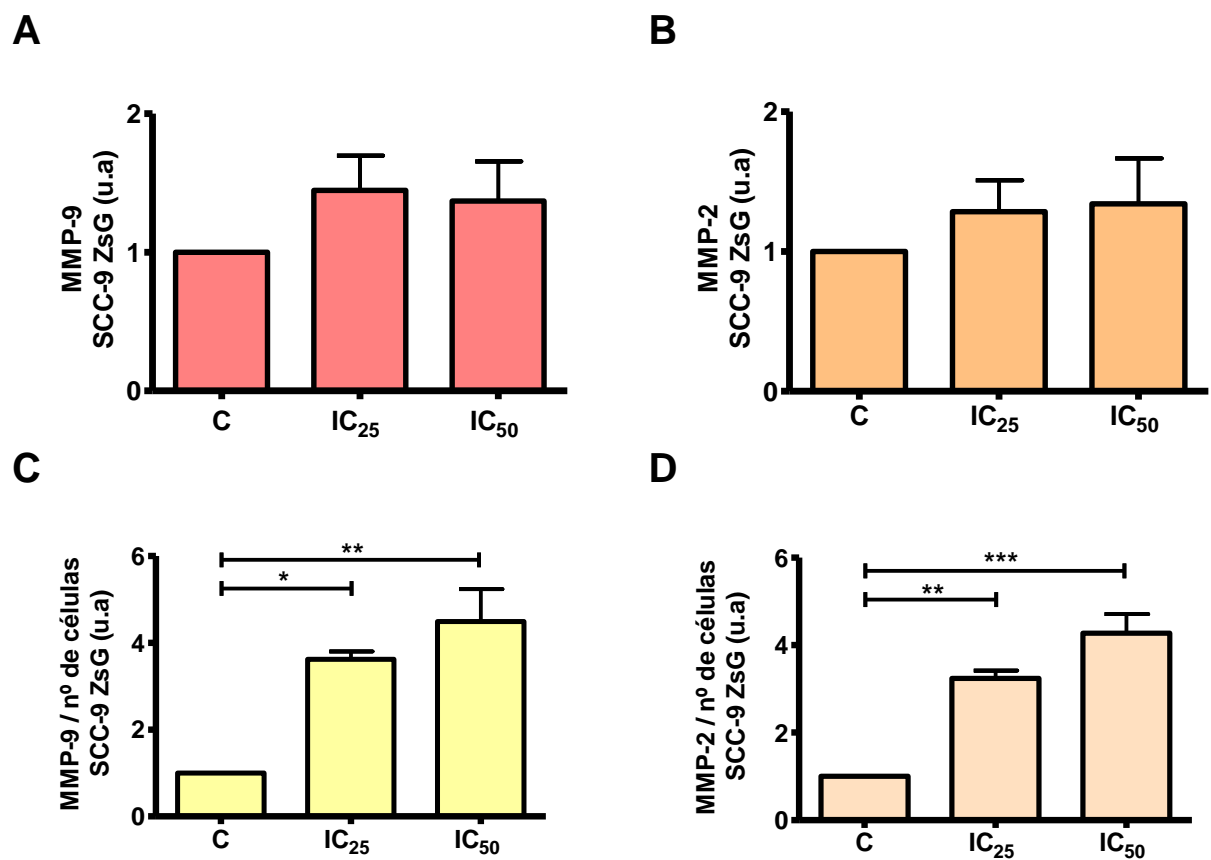
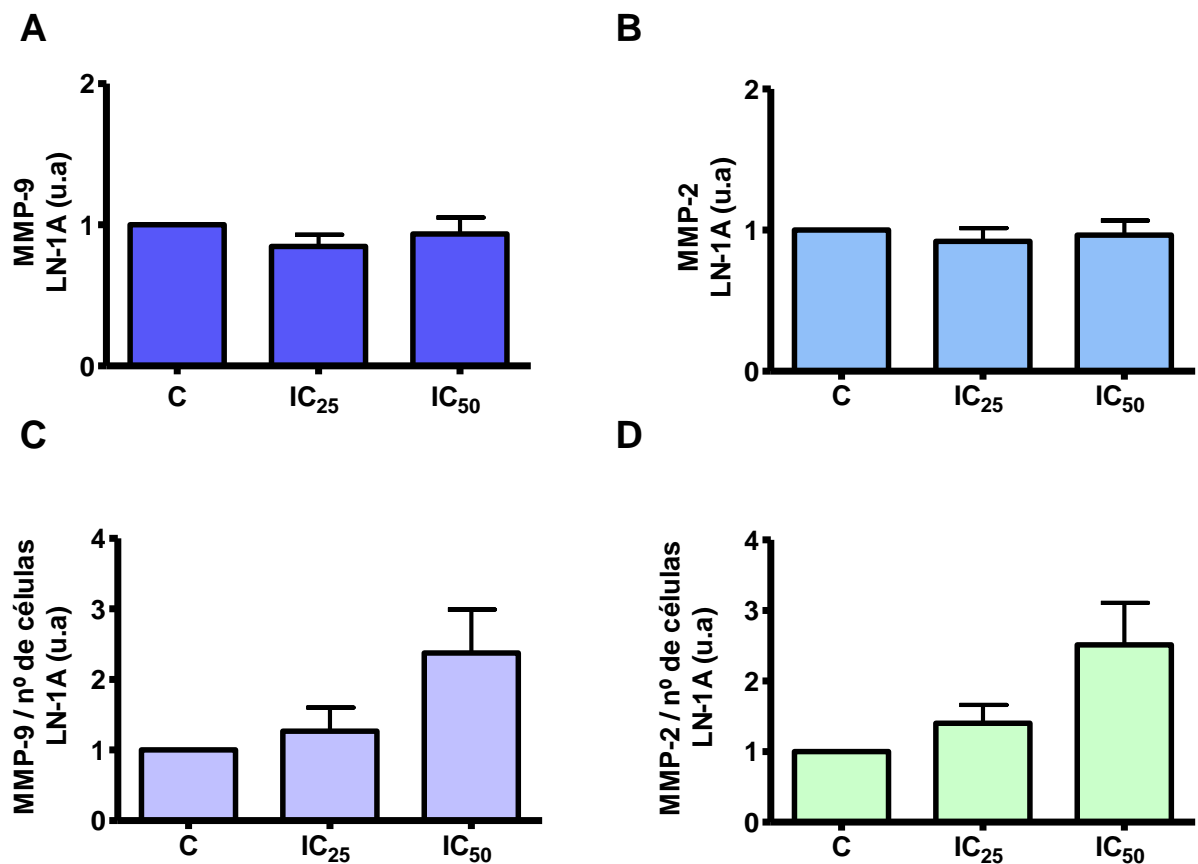


Gráfico 14 – Efeito do tratamento com TVB-3166 sobre a atividade gelatinolítica das MMPs -2 e -9 nas células LN-1A, após 48 horas de tratamento. **A** – A atividade da MMP-9 não é modificada ou é discretamente diminuída pelo tratamento, mas sem significância estatística. **B** – A atividade da MMP-2 também não se modifica significativamente nas células tratadas em relação às células controle. **C** – Os tratamentos passam a mostrar aumento da atividade da MMP-9, em relação ao controle, após normalização dos resultados pelo número de células remanescentes, porém sem significância estatística. **D** – A atividade da MMP-2 é também se mostra aumentada pelos tratamentos, após a normalização dos resultados como descrito em C, também sem diferenças estatisticamente significantes. Os gráficos representam a média de três experimentos independentes. C: controle; Anova One-way com teste de Tukey.



5.8 Efeito do TVB-3166 sobre a adesão das células SCC-9 ZsG e LN-1A ao miogel

Com o objetivo de avaliar o efeito do inibidor de FASN TVB-3166 sobre a adesão das células SCC-9 ZsG e LN-1A à matriz extracelular, foram realizados ensaios de adesão sobre miogel, composto por fibronectina, laminina, integrinas, colágenos (tipos I, III, IV, XII e XIV) e outras proteínas. Esta matriz gelatinosa é derivada de leiomioma de útero humano e sua composição protéica mimetiza o microambiente tumoral (Salo et al., 2015). Para isto, ambas as linhagens celulares foram previamente tratadas com TVB-3166 por 48 horas, semeadas em poços sensibilizados com miogel ou apenas com BSA 3%, a fim de verificar a adesão específica das células ao miogel.

As duas linhagens celulares estudadas apresentaram um aumento da adesão ao miogel após o tratamento com TVB-3166. Nas células SCC-9 ZsG, tanto a IC_{25} como a IC_{50} do TVB-3166 provocaram um aumento em torno de 50% da adesão, quando comparado ao controle ($p=0,0091$). Poços sensibilizados com BSA a 3% foram utilizados como controles de adesão, que foi muito baixa e não modificada pelos tratamentos realizados ($p=0,3272$), como evidenciado no **gráfico 15**. O tempo médio de adesão das células SCC-9 ZsG ao miogel foi de 40 minutos e a **figura 11** representa a distribuição das células aderidas após a finalização do experimento. Nela podemos observar que o número de células aderidas nos tratamentos é superior ao controle com miogel e sem diferenças significativas nos poços somente com BSA. Na linhagem metastática LN-1A, efeitos similares foram observados (**gráfico 16**). A adesão ao miogel foi 1,8 vezes maior nas células tratadas com a IC_{25} e a IC_{50} do que nas células controle ($p=0,0150$), enquanto a adesão ao BSA 3% foi discretamente aumentada, sem significância estatística ($p=0,5710$). O tempo médio de adesão das células LN-1A ao miogel foi de 25 minutos e a quantidade de células aderidas foi maior nos tratamentos do que nos controles, como representado na **figura 12**.

Gráfico 15 – Efeito do TVB-3166 sobre a adesão nas células SCC-9 ZsG, após 48 horas de tratamento. As IC₂₅ e IC₅₀ provocaram aumento da adesão das células ao miogel, ao passo que a adesão ao BSA 3% foi baixa e não se alterou com o tratamento. Os gráficos representam a média de três experimentos independentes. C: controle; ** p<0,01. Anova One-way com teste de Tukey.

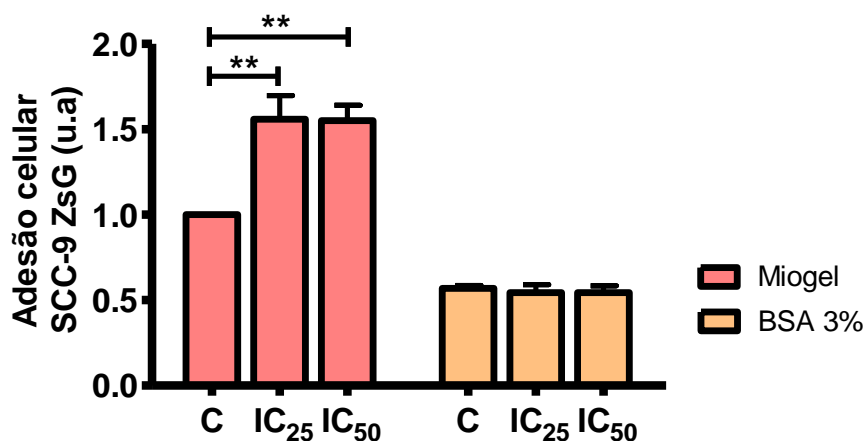


Figura 11 – Fotomicrografias representativas do ensaio de adesão celular ao miogel com as células SCC-9 ZsG, após o tratamento com TVB-3166. As células aderidas foram fixadas com TCA a 10% e coradas com cristal violeta a 0,1%. Pode-se observar que os tratamentos provocaram um aumento no número de células aderidas ao miogel em relação aos controles. A adesão ao BSA 3% foi muito baixa e não se modificou com os tratamentos. C: controle; microscopia de contraste de fase, aumento original de 100x.

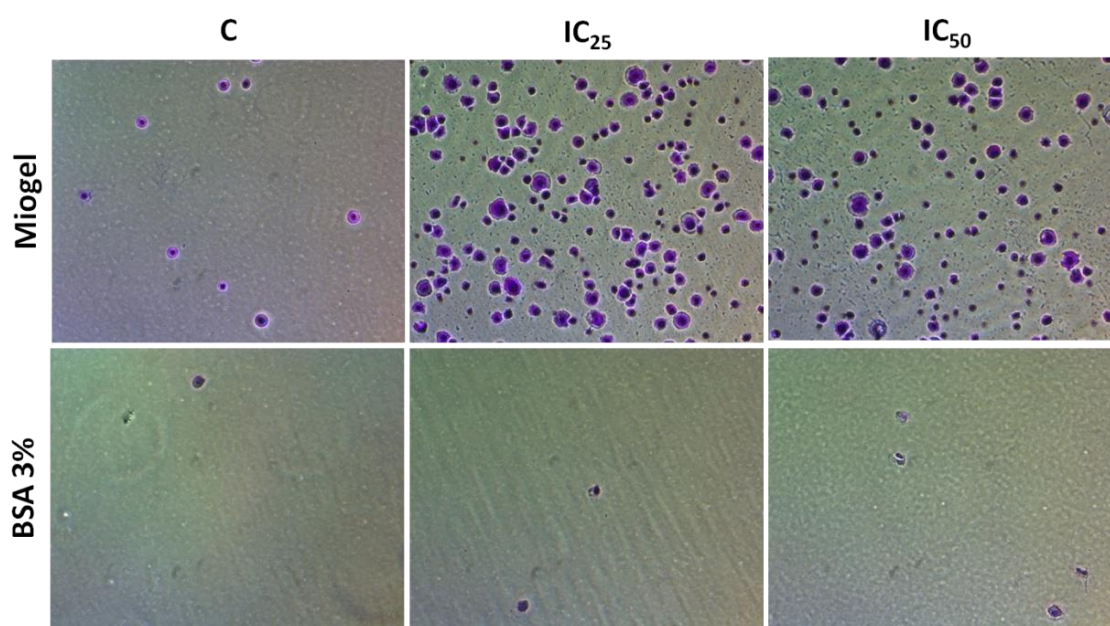


Gráfico 16 – Efeito do TVB-3166 sobre a adesão das células LN-1A após 48 horas de tratamento. As IC_{25} e IC_{50} provocaram aumento da adesão das células ao miogel, enquanto que a adesão ao BSA 3% foi baixa e discretamente aumentada, porém sem significância estatística. Os gráficos representam a média de três experimentos independentes. C: controle; * $p < 0,05$. Anova One-way com teste de Tukey.

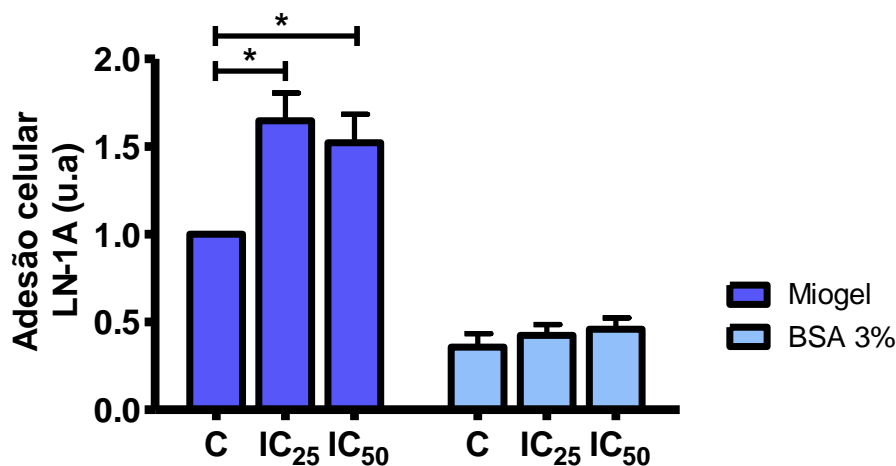
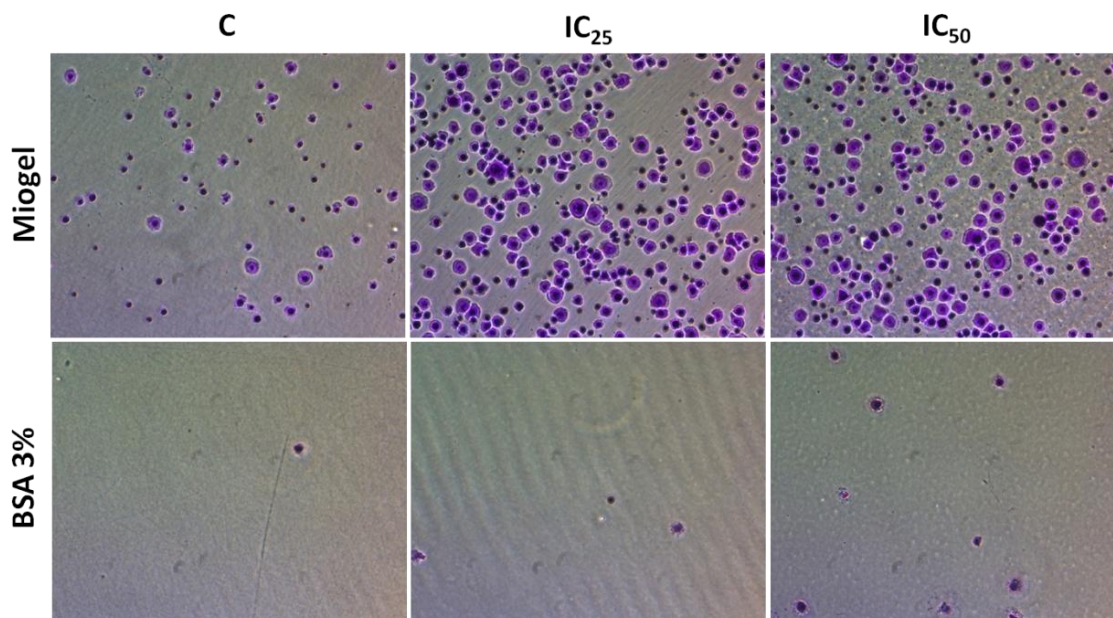


Figura 12 – Fotomicrografias representativas do ensaio de adesão celular ao miogel das células LN-1A após o tratamento com TVB-3166. As células aderidas foram fixadas com TCA a 10% e coradas com cristal violeta a 0,1%. Pode-se observar que os tratamentos provocaram um aumento no número de células aderidas ao miogel em relação aos controles. A adesão ao BSA 3% foi muito baixa e não modificada pelos tratamentos. C: controle; microscopia de contraste de fase, aumento original de 100x.



6 DISCUSSÃO

O CEC oral é um importante problema de saúde pública e sua prevalência continua aumentando no Brasil e no mundo. Está associado a índices consideráveis de recidivas precoces e metástases para os linfonodos cervicais, o que justifica as altas taxas de morbidade e mortalidade relacionadas a esta condição. Apesar dos avanços tecnológicos e científicos, o CEC oral ainda apresenta prognóstico ruim e baixas taxas de sobrevida que permanecem em torno de 55% após 5 anos. A cirurgia é o tratamento de escolha, no entanto, a quimioterapia é utilizada em pacientes que possuem tumores em estágio avançado, sendo a cisplatina isolada ou em combinação com outras drogas, o agente quimioterápico de escolha. Entretanto, a quimioterapia empregada para o tratamento de pacientes acometidos pelo CEC oral ainda apresenta resultados clínicos limitados, e por isto, a busca de terapias mais eficientes do que as existentes hoje se torna necessária (Fury e Pfister, 2011; van Dijk et al., 2016; Cannon et al., 2017; Bray et al., 2018).

Nas últimas décadas, a pesquisa sobre o câncer avançou significativamente quanto ao grau de compreensão dos eventos moleculares na sua patogênese e os modelos *in vitro* ainda são ferramentas valiosas para o estudo do comportamento tumoral e desenvolvimento de novas terapias contra o câncer. Tendo em vista que as alterações genéticas presentes em linhagens de células malignas são semelhantes às alterações existentes nos tumores de origem, a disponibilidade de um modelo utilizando-se linhagens celulares que se assemelham ao subtipo do tumor estudado é, portanto, fundamental (Boot et al., 2016), assim como a determinação de modelos que representem o tumor primário e o tumor metastático, possibilitando a investigação de mecanismos envolvidos nos processos de invasão e metástase. Neste contexto, Agostini et al. (2014), por meio de seleção *in vivo* após implantação subcutânea em camundongos BALB/c nude de células SCC-9, derivadas de tumor primário de CEC oral, transduzidas com a sequência da proteína ZsGreen, obtiveram uma linhagem metastática a partir de linfonodos axilares metastáticos denominada de LN-1. Entretanto, as células LN-1 originais sofreram alterações fenotípicas ao longo dos sucessivos subcultivos no laboratório e perderam, em grande parte, sua capacidade metastática. Por esta razão, uma nova linhagem foi estabelecida e denominada LN-1A na presente pesquisa (Moreira FS, 2017).

A expressão e a atividade de FASN é geralmente baixa ou até mesmo ausente na maioria dos tecidos humanos normais, porém está aumentada em diversas neoplasias malignas de origem epitelial, incluindo mama, ovário, próstata, cólon, pulmão, pâncreas, estômago, bexiga, melanoma e CEC oral (Alo et al., 1996; Pizer et al., 1996; Krontiras et al., 1999; Visca et al., 1999; Piyathilake et al., 2000; Kusakabe et al., 2002; Innocenzi et al., 2003; Rossi et al., 2003; Alo et al., 2007; Sugino et al., 2011), bem como sarcomas de tecidos moles (Takahiro et al., 2003). Vários estudos correlacionam a atividade aumentada de FASN com agressividade tumoral, resistência aos quimioterápicos e reduzida sobrevida de pacientes em diferentes tipos de tumores (Gansler et al., 1997; Alo et al., 2007; Menendez e Lupu., 2007; Witkiewicz et al., 2008; Liu et al., 2008; Murata et al., 2010; Zeng et al., 2010; Zaytseva et al., 2012, revisado por Rohring e Schulze, 2016). A existência desta relação entre a expressão e prognóstico sugere que FASN desempenhe um papel importante na biologia das células tumorais e na resposta terapêutica, o que a torna um possível alvo quimioterápico. Nas duas últimas décadas, diversos inibidores farmacológicos da atividade de FASN foram desenvolvidos e avaliados em estudos pré-clínicos, e seus efeitos estão relacionados ao bloqueio do ciclo celular com redução significativa da proliferação e aumento das taxas de apoptose em células neoplásicas de diferentes origens histológicas (Pizer et al., 1998; Li et al., 2001; Menendez et al., 2004; Menendez e Lupu, 2005a; Agostini et al., 2014).

Em nosso laboratório, já demonstramos a eficácia do orlistat em diferentes linhagens celulares e modelos animais de CEC oral e de melanoma pela redução da proliferação, aumento da apoptose, diminuição da disseminação metastática, além da modulação da angiogênese e da linfangiogênese (Carvalho et al., 2008; Seguin et al., 2012; Agostini et al., 2014; Almeida LY, 2015 dados ainda não publicados; Bastos et al., 2017; Moreira FS, 2017 dados ainda não publicados). Embora vários inibidores de FASN tenham mostrado efeitos citotóxicos potentes em diferentes linhagens celulares e modelos xenográficos, a maioria deles, incluindo o orlistat, muito utilizado por nosso grupo de pesquisa, apresentam limitações conferidas pelas suas propriedades farmacológicas e por seus efeitos colaterais, que dificultam ou impedem sua utilização em ensaios clínicos (Menendez e Lupu, 2017). Entretanto, estudos recentes evidenciam que o inibidor reversível de FASN TVB-3166 e seus análogos são altamente seletivos, potentes e exibem ampla atividade antitumoral em diversos ensaios pré-clínicos, sendo bem tolerados em modelos animais (Benjamin et al., 2015; Ventura et al., 2015; Heuer et al., 2017; Jafari et al., 2018; Zaytseva et al., 2018; Tao et al., 2019). Adicionalmente, o TVB-2640, um dos análogos do TVB-3166,

já está sendo testado clinicamente em pacientes com tumores sólidos (ClinicalTrials.gov:NCT03179904) sob a forma de monoterapia ou combinado com outros agentes, apresentando excelente biodisponibilidade oral e evidências promissoras de eficácia clínica em doses bem toleradas pelos pacientes (O'Farrell et al., 2015; Dean et al., 2016). Portanto, na presente pesquisa, buscamos avaliar pela primeira vez os efeitos *in vitro* do TVB-3166 sobre as células de CEC de língua SCC-9 ZsG e LN-1A estabelecidas em nosso laboratório.

O primeiro objetivo deste estudo foi estabelecer a IC_{50} para cada linhagem celular, a fim de se evitar possíveis efeitos citotóxicos inespecíficos. Observamos que TVB-3166 reduz a viabilidade celular de maneira progressiva, revelando uma IC_{50} de 30 μ M e 37 μ M para as células SCC-9 ZsG e LN-1A, respectivamente. As células SCC-9 ZsG se mostraram discretamente mais sensíveis a esta droga do que a linhagem metastática LN-1A, além do mais, constatamos também que a sensibilidade de ambas as linhagens celulares ao TVB-3166 foi reduzida com o aumento da concentração de SFB no meio de cultura. Similarmente aos nossos resultados, Ventura et al. (2015) mostraram que o TVB-3166 reduz a viabilidade de forma dose-dependente de mais de noventa linhagens celulares derivadas de diversas neoplasias malignas e concluíram que o aumento de SFB resulta na redução de 20-50% da sensibilidade, dependendo do tipo celular. Estes achados sugerem que a eficácia do TVB-3166 está relacionada à disponibilidade de ácidos graxos exógenos no meio de cultura, e o aumento do SFB pode compensar parcialmente o efeito deste inibidor sobre a viabilidade celular. Neste mesmo trabalho, foram encontrados baixos valores da IC_{50} e os ensaios funcionais realizados com concentrações de TVB-3166 de até 300 vezes menores do que utilizamos em nossas linhagens celulares. No entanto, esta discrepância pode ser justificada, ao menos em parte, pela diferença no tempo em que as células foram expostas à droga, visto que buscamos avaliar os efeitos do TVB-3166 em um período relativamente curto de tratamento, enquanto Ventura et al. (2015) avaliaram estes efeitos mais tardiamente, com um período de tratamento de 7 dias. Em contrapartida, Tao et al. (2019) avaliaram a viabilidade de células derivadas de câncer de bexiga por um período de 72 horas e o valor da IC_{50} foi aproximadamente 3 vezes maior do que utilizamos em nossas células.

O câncer tem como característica primordial o crescimento celular descontrolado, portanto, dados de proliferação celular são importantes na avaliação da carcinogênese e progressão tumoral (Hanahan e Weinberg, 2011). Trabalhos prévios do nosso grupo de pesquisa mostram que a FASN é importante para a proliferação de células derivadas de CECs

orais (Agostini et al., 2004; Silva et al., 2008b). Em outros estudos *in vitro* com diversas linhagens celulares, já foi demonstrado que a inibição de FASN com orlistat resulta no bloqueio do ciclo celular na fase G0/G1 e retardo na entrada da fase S, provocando morte celular por apoptose (Pizer et al., 1998; Kridel et al., 2004; Menendez e Lupu, 2005a; Carvalho et al., 2008; Seguin et al., 2012; Bastos et al., 2017). Agostini et al. (2014), demonstraram que as células SCC-9 tratadas com orlistat durante 72 horas tiveram aumento dose-dependente das populações celulares em G0/G1, redução do número de células na fase S, seguido de aumento na taxa de apoptose. Neste mesmo trabalho, as células LN-1 apresentaram aumento significativo em G0/G1 e redução da fase S após 72 horas de tratamento, acompanhado por um aumento dose-dependente da apoptose. De acordo com estes achados, estudos mais recentes (ainda não publicados) do nosso grupo de pesquisa avaliaram os efeitos de diferentes inibidores farmacológicos da FASN (C75, triclosan e orlistat) sobre o ciclo celular nas células SCC-9 após 24 e 48 horas de tratamento e mostraram que os tratamentos resultam em parada do ciclo celular na fase G0/G1 e redução da fase S, sendo o maior efeito observado com triclosan e orlistat. Além disso, os resultados de Moreira FS (2017) revelam que o tratamento com a IC₅₀ do orlistat (280 µM) na linhagem metastática LN-1A resulta em um aumento de 55% do número de células nas fases G0/G1 e redução de 63,25 % na fase S após 36 horas de tratamento, corroborando assim os dados de Agostini et al., 2014.

No presente estudo, a capacidade de proliferação das células SCC-9 ZsG e LN-1A foi avaliada por meio da análise da distribuição destas células nas fases do ciclo celular e pela contagem do número de células aderidas aos poços das placas de cultura. Inicialmente, observamos que o TVB-3166 provocou uma redução do número de células aderidas aos poços nos três tempos avaliados (24, 48 e 72 horas), sendo este efeito mais evidente nas células SCC-9 ZsG do que na linhagem metastática LN-1A, que apresentou redução da proliferação celular com significância estatística somente após o período de 24 horas. De forma similar, estudos prévios em nosso laboratório avaliaram o número de células LN-1 aderidas aos poços após 24 e 48 horas de tratamento com orlistat e outras drogas, concluindo que as células tratadas apenas com orlistat apresentaram discreta redução do número de células aderidas, porém sem significância estatística (Almeida LY, 2015). A partir destes dados iniciais de proliferação, buscamos avaliar o efeito do TVB-3166 sobre o ciclo celular após 48 horas de tratamento e constatamos que a exposição das células SCC-9 ZsG e LN-1A a esta droga provoca acúmulo de células na fase G0/G1 e redução considerável no número de células na

fase S. Estes efeitos são semelhantes ao observado com outros inibidores de FASN anteriormente descritos, no entanto, quando comparamos ao orlistat, os valores da IC_{50} do TVB-3166 nas células SCC-9 ZsG e LN-1A são 9,3 vezes inferiores em relação a IC_{50} do orlistat utilizada em estudos prévios de nosso laboratório.

Múltiplas vias de sinalização que regulam a proliferação e a sobrevivência de células neoplásicas, incluindo as vias PI3K-AKT-mTOR e β -catenina, podem ser afetadas pela inibição de FASN. O TVB-3166 provoca o remodelamento da membrana celular das células tumorais, gerando efeitos nas vias de transdução de sinal envolvidos com o controle da proliferação celular (Heuer et al., 2017). Ventura et al. (2015) concluíram que a inibição de FASN com TVB-3166 resulta na inibição da fosforilação de Akt e da proteína ribossomal S6 em linhagens celulares de pulmão, cólon, próstata, ovário e mama. Partindo disto, estes autores buscaram identificar uma associação entre as características genéticas conhecidas e o perfil de inibição de Akt e S6. De modo geral, os dados sugerem que as células tumorais com mutações em RAS, BRAF, PTEN ou ErbB2 tem maior probabilidade de apresentar inibição de Akt, enquanto a inibição mais forte de S6 foi observada em uma linhagem celular com mutação em PIK3CA. De acordo, Zaytseva et al. (2018) correlacionaram o nível de expressão de FASN com os de pAkt e pAMPK em culturas primárias e tecidos tumorais derivados de câncer colorretal e concluíram que linhagens celulares tratadas com TVB-3166 e outros análogos (TVB-3664 e TVB-3693) apresentam redução significativa na proliferação, no entanto, as células mais resistentes à inibição de FASN parecem estar associadas a um elevado nível basal de ativação de pAkt e pAMPK. Os extratos proteicos dos tecidos tumorais revelaram níveis mais altos de pAkt e pAMPK entre os modelos de PDX mais resistentes à inibição de FASN, enquanto não foram observadas alterações significativas na ativação de pAMPK ou pAkt nos outros modelos de PDX identificados como sensíveis à inibição de FASN. Sendo assim, torna-se necessário avaliar, em experimentos futuros, a ativação da via PI3K-AKT-mTOR nas nossas linhagens celulares expostas ao TVB-3166 com objetivo de elucidar um possível mecanismo de resistência à inibição de FASN, uma vez que observamos que a linhagem metastática LN-1A é menos sensível ao tratamento com TVB-3166 do que as células SCC-9 ZsG.

A indução da apoptose é um dos efeitos mais desejados no tratamento quimioterápico e os inibidores da atividade de FASN são capazes de bloquear a progressão do ciclo celular, diminuindo a proliferação e ao mesmo tempo aumentando as taxas de apoptose em diferentes linhagens celulares malignas (Jiang et al., 2012; Rossato et al., 2014). Em

concordância com os dados presentes na literatura, nossos resultados revelam que o TVB-3166 provoca aumento das taxas de apoptose nas células SCC-9 ZsG e LN-1A, no entanto, nossos dados só obtiveram significância estatística quando avaliamos as populações celulares duplamente marcadas para anexina V-PE e 7AA-D – PerCP, indicando que estas células estavam em estágio tardio de apoptose. Em contraste aos nossos resultados, Ventura et al. (2015), avaliaram o processo de morte celular em células tumorais de pulmão (Calu-6) e de próstata (22Rv1) tratadas com TVB-3166 e observaram um aumento de 5 vezes na marcação com anexina V, além de baixa marcação nas populações duplamente positivas, indicando que as células estavam sofrendo apoptose ao invés de morrer por necrose. Além disso, estes autores observaram também um aumento significativo da expressão da PARP clivada à medida que a concentração de TVB-3166 foi aumentada, confirmando a morte celular por apoptose.

O mecanismo de apoptose associado à inibição de FASN pelo TVB-3166 está, aparentemente, relacionado à ruptura dos “*rafts lipídicos*” que controlam a sinalização oncogênica das vias metabólicas, gerando alterações drásticas na expressão gênica das células tumorais, o que provoca a depleção do palmitato e consequente acúmulo de malonil-CoA, que por sua vez desencadeia a apoptose (Benjamin et al., 2015). A resistência aos mecanismos de indução da apoptose tem sido reconhecida como uma das características essenciais para o estabelecimento do câncer. Neste sentido, a necrose pode desempenhar um papel muito importante na tumorigênese como um mecanismo de morte celular secundário em células malignas deficientes em apoptose (Hitomi et al., 2008). Curiosamente, nossas linhagens celulares apresentaram altas taxas de necrose, sendo este efeito mais nítido nas células SCC-9 ZsG, que apresentaram o dobro da quantidade de células necróticas quando comparada as células controle. Entretanto, ainda não existem relatos na literatura que correlacionem à inibição de FASN e a indução de necrose. Barac et al. (2017) avaliaram as taxas de apoptose e necrose nas células SCC-9 após exposição à nimesulida e à cisplatina e detectaram um aumento significativo no número de células apoptóticas e necróticas com a terapia combinada. Estes autores justificaram este achado devido à diminuição significativa do conteúdo de ATP e da carga energética nas células SCC-9 após o tratamento combinado. Além disso, sugerem que dependendo do nível de dano celular, a necrose pode ocorrer diretamente ou como consequência do processo apoptótico inacabado. Assim, para elucidar os nossos resultados de apoptose e necrose nas células SCC-9 ZsG e LN-1A, são necessários estudos que busquem investigar o efeito do TVB-3166 sobre vias moleculares de morte celular.

As metástases são as principais causas de morte relacionadas ao câncer, e múltiplos eventos moleculares estão envolvidos nesse processo. A migração celular é um processo crucial na progressão do câncer, pois confere às células tumorais a habilidade de migrar através dos vasos sanguíneos ou linfáticos, colonizando sítios anatómicos distantes (Lamouille et al., 2014). Estudos na literatura já relataram que a FASN contribui para a migração e invasão de células tumorais (Long et al., 2013; Zhou et al., 2016; Gong et al., 2017), portanto, buscamos avaliar o efeito do TVB-3166 sobre a migração das células SCC-9 ZsG e LN-1A. Nossos dados revelaram diferenças significativas no potencial migratório entre as duas linhagens celulares, pois observamos que o TVB-3166 interfere na capacidade de migração da linhagem metastática LN-1A somente após 12 horas de tratamento, enquanto as células SCC-9 ZsG tiveram seu potencial migratório reduzido em todos os períodos de tempo analisados. Diferente dos nossos resultados, Agostini et al. (2014) concluíram que a inibição de FASN pelo orlistat reduz a migração das células LN-1 após 18 horas de tratamento, o que foi evidentemente refletido no modelo ortotópico de CEC oral que mostrou redução significativa do crescimento tumoral e do número de metástases regionais. No entanto, os achados de Almeida LY (2015) revelam que orlistat não altera a capacidade de migração das células LN-1 por meio de ensaios de migração em monocamada e de *transwell*. De acordo com o observado na linhagem parental SCC-9 ZsG, Jafari et al. (2018) avaliaram a capacidade migratória sobre diferentes parâmetros e concluíram que o TVB-3664 diminui significativamente a velocidade, a direção, o trajeto e a distância do ponto de origem das células malignas derivadas de tumor primário de câncer colorretal. Para investigar se a FASN promove a migração celular, estes autores realizaram a superexpressão da FASN, que resultou em aumento significativo em todos os parâmetros de migração celular analisados. Adicionalmente, este estudo revelou que as alterações mediadas pela FASN nas vias de sinalização associadas à migração celular ocorrem através da regulação positiva do metabolismo de esfingolipídios e que a inibição da FASN pelo TVB-3664 leva à diminuição da ativação de p-MET, p-FAK, p-PAX e RhoA.

A degradação excessiva da matriz extracelular tem um papel importante em diversas condições patológicas, incluindo na progressão do câncer (Egeblad e Werb, 2002). As metaloproteinases de matriz (MMPs) constituem uma família de enzimas zinco-dependentes que degradam várias moléculas da matriz extracelular, sendo essenciais para os processos de invasão tumoral e metástase (Tajhya et al., 2017). Estudos já revelaram que células malignas de estômago, mama, bexiga, colón e reto, assim como as de melanoma,

expressam MMPs, particularmente as MMP-1, -2 e -9 (Jin et al., 2010; Zheng et al., 2013; Shaverdashvili et al., 2013; Zaytseva et al., 2014; Lian et al., 2016). Zhang et al. (2006) observaram, em modelo animal de CEC oral, que os níveis de mRNA e da proteína MMP-2 estão elevados durante o desenvolvimento do tumor, sendo mais altos nas metástases localizadas nos linfonodos cervicais. Em trabalho realizado por nosso grupo, foi demonstrada uma correlação entre a atividade de MMP-2 e -9 e a redução no tempo de sobrevida livre de doença em pacientes portadores de câncer de boca (Yorioka et al., 2002). Zaytseva et al. (2014) fornecem evidências de que a FASN regula a biodisponibilidade das isoformas de VEGF-A, pelo menos em parte, por uma regulação positiva da expressão e atividade enzimática de MMPs, em particular MMP-9. Estes autores demonstraram, por meio de western blot e zimografia, que o silenciamento estável de FASN leva a uma diminuição significativa no nível de MMP-9 em linhagens celulares de câncer colorretal e que em tumores ortotópicos o *knockdown* de FASN promove redução na expressão de MMP-9 associada à diminuição significativa de VEGF-A na matriz extracelular, particularmente em áreas altamente vascularizadas.

Entretanto, os resultados desta dissertação sugerem que o TVB-3166 não modula a atividade das MMP -2 e -9 nas células SCC-9 ZsG e LN-1A. Os ensaios zimográficos para estas metaloproteinases só apresentaram significância estatística após a normalização dos resultados, o que é decorrente do efeito citotóxico e antiproliferativo do TVB-3166. Além disso, acreditamos que o período experimental escolhido (48 horas) foi relativamente curto, o que permitiu o acúmulo das MMPs -2 e -9 no meio de cultura. De acordo com os resultados aqui apresentados, trabalhos prévios de nosso grupo, revelaram que o orlistat não modula a atividade das MMPs -2 e -9 em células de melanoma (B16-F10), dentro de um período de tratamento de 24 horas (Carvalho MA, 2010 dados ainda não publicados). Entretanto, apesar da aparente falta de efeito do TVB-3166 em experimentos de cultura celular, não podemos descartar um possível efeito *in vivo* da inibição de FASN sobre as MMPs.

Os processos de invasão tumoral e metástases requerem alterações moleculares nas interações célula-célula e célula-matriz extracelular, sendo assim, moléculas de adesão celular são essenciais para tumorigênese (Lyons e Jones, 2007). Mishra et al. (2018) avaliaram a expressão de genes envolvidos na adesão celular em células-tronco isoladas de CECs orais e identificaram que células CD44⁺ apresentam a expressão diminuída dos genes *PCDH18*, *MGP*, *SPARCL1* e *KRTDAP* quando comparadas as células CD44⁻ e a menor expressão de *PCDH18*, uma molécula de adesão célula-célula, correlacionou-se com piora na

sobrevida global dos pacientes. Zaytseva et al. (2012) observaram que o silenciamento estável da FASN em células de câncer colorretal inibe a atividade de MET, Akt, FAK e paxilina, que são proteínas conhecidas por regular a adesão, migração e invasão celular. Corroborando com estes resultados, Jafari et al. (2018) sugeriram que a lipogênese *de novo* e o metabolismo dos esfingolípídios contribuem para a migração e invasão de células malignas de câncer colorretal por meio da formação de complexos de adesão focais e invasopódios. Estes autores demonstraram que a inibição de FASN pelo TVB-3664 diminui o número de placas de adesão focais em células de tumor primário e metastático de câncer colorretal por imunofluorescência com os anticorpos p-FAK e p-paxilina. Além disso, verificaram também que as células tratadas com TVB-3664 tiveram a capacidade gelatinolítica reduzida.

No presente estudo, como anteriormente descrito, o TVB-3166 não alterou a migração nas células LN-1A, e por isso, buscamos avaliar o efeito deste inibidor sobre a adesão das células SCC-9 ZsG e LN-1A a fim de elucidar um possível mecanismo que explicasse tal achado. De fato, observamos um aumento da adesão ao miogel em ambas as linhagens celulares tratadas com o TVB-3166, sendo este efeito mais evidente na linhagem metastática LN-1A. Tendo em vista que o miogel é uma matriz constituída por cerca de 760 proteínas, não podemos afirmar especificamente em qual o componente da matriz extracelular o TVB-3166 está aumentando a adesão das células SCC-9 ZsG e LN-1A. Entretanto, em trabalhos ainda não publicados do nosso grupo de pesquisa, foram avaliados os efeitos de diferentes inibidores farmacológicos de FASN sobre a adesão das células SCC-9 ao colágeno tipo I e a fibronectina. Os resultados revelam que adesão das células SCC-9 aos componentes da matriz foi significativamente reduzida pelo triclosan, no entanto, o tratamento com C75 aumentou a adesão e com orlistat não houve alteração na adesão destas células. Carvalho MA (2010) observou que a interação entre os componentes da matriz extracelular (laminina e fibronectina) reconhecidamente ligantes das integrinas $\alpha\beta3$ e $\alpha5\beta1$ foi aumentada nas células de melanoma (B16-F10) tratadas com orlistat ou cerulenina. No entanto, este autor sugere que o aumento observado provavelmente não ocorreu através de $\alpha\beta3$, pois ensaios de imunofluorescência revelaram que orlistat reduz a expressão desta integrina. Desta forma, para melhor compreender nossos dados de adesão nas células SCC-9 ZsG e LN-1A, são necessários novos estudos que investiguem o efeito do TVB-3166 sobre as vias moleculares envolvidas no processo de adesão celular, bem como, avaliar o efeito deste inibidor sobre componentes específicos da matriz extracelular.

Em resumo, os achados desta dissertação mostram que o inibidor de FASN TVB-3166 apresenta efeito antiproliferativo e citotóxico em células de CEC oral obtidas de tumor primário e metastáticas. Observamos também que o tratamento com TVB-3166 reduz a migração das células SCC-9 ZsG, o que só foi observado na linhagem metastática LN-1A após 12 horas de tratamento. Adicionalmente, o TVB-3166 não modulou a atividade das MMPs -2 e -9, no entanto, provocou aumento da adesão ao miogel nas SCC-9 ZsG e LN-1A. Diante disso, os dados aqui apresentados podem servir de base para futuros ensaios *in vitro* e *in vivo* que devem ser realizados para uma melhor avaliação do potencial de aplicação clínica do inibidor de FASN em CECs de cabeça e pescoço.

7 CONCLUSÃO

7.1 O TVB-3166 reduz a viabilidade de maneira progressiva nas células SCC-9 ZsG e LN-1A.

7.2 As IC_{50} para o TVB-3166 nas células SCC-9 ZsG e LN-1A são de 30 μ M e 37 μ M, respectivamente.

7.3 A proliferação das células SCC-9 ZsG é reduzida após 24, 48 e 72 horas de tratamento com TVB-3166, enquanto nas células LN-1A a redução só ocorreu após 24 horas de tratamento.

7.4 O TVB-3166 provoca o acúmulo de células na fase G0/G1, redução do número de células na fase S e não modifica a fase G2/M nas células SCC-9 ZsG e LN-1A.

7.5 As taxas de morte celular (apoptose e necrose) são aumentadas após o tratamento com TVB-3166 nas células SCC-9 ZsG e LN-1A.

7.6 A migração celular é reduzida nas células SCC-9 ZsG após 6, 12 e 24 horas de tratamento com TVB-3166, enquanto na linhagem metastática LN-1A a redução só ocorre após 12 horas de tratamento.

7.7 O TVB-3166 não modula a atividade das MMP-2 e -9 secretadas pelas células SCC-9 ZsG e LN-1A.

7.8 A adesão celular ao miogel é aumentada pelo tratamento com TVB-3166 nas células SCC-9 ZsG e LN-1A.

REFERÊNCIAS*

Agostini M, Silva SD, Zecchin KG, Coletta RD, Jorge J, Loda M, Graner E. Fatty acid synthase is required for the proliferation of human oral squamous carcinoma cells. *Oral Oncol.* 2004 Aug;40(7):728-35.

Agostini M, Almeida LY, Bastos DC, Ortega RM, Moreira FS, Seguin F, et al. The fatty acid synthase inhibitor orlistat reduces the growth and metastasis of orthotopic tongue oral squamous cell carcinomas. *Mol Cancer Ther.* 2014 Mar;13(3):585-95

Alli PM, Pinn ML, Jaffee EM, McFadden JM, Kuhajda FP. Fatty acid synthase inhibitors are chemopreventive for mammary cancer in neu-N transgenic mice. *Oncogene.* 2005 Jan 6;24(1):39-46.

Almangush A, Coletta RD, Bello IO, Bitu C, Keski-Säntti H, Mäkinen LK et al. A novel prognostic model for early stage oral tongue cancer. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2015 Feb;44(2):143-50.

Amar A, Rapoport A, Curioni OA, Dedivitis RA, Cernea CR, Brandão LG. Prognostic value of regional metastasis in squamous cell carcinoma of the tongue and floor of mouth. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2013 Nov-Dec;79(6):734-7.

Almeida JP, Coletta RD, Silva SD, Agostini M, Vargas PA, Bozzo L, Graner E. Proliferation of fibroblasts cultured from normal gingiva and hereditary gingival fibromatosis is dependent on fatty acid synthase activity. *J Periodontol.* 2005 Feb;76(2):272-8.

Almeida LY. Estudo dos efeitos do inibidor da ácido graxo sintase Orlistat associado a 5-fluorouracil, cisplatina e Paclitaxel em carcinoma espinocelular oral: estudo em linhagem celular e em modelo ortotópico (Tese). Piracicaba: Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, 2015.

Alo PL, Amini M, Piro F, Pizzuti L, Sebastiani V, Botti C, et al. Immunohistochemical expression and prognostic significance of fatty acid synthase in pancreatic carcinoma. *Anticancer Res.* 2007 Jul-Aug;27(4B):2523-7.

Alo PL, Visca P, Marci A, Mangoni A, Botti C, Di Tondo U. Expression of fatty acid synthase (FAS) as a predictor of recurrence in stage I breast carcinoma patients. *Cancer.* 1996 Feb 1;77(3):474-82.

*De acordo com as normas da UNICAMP/FOP, baseadas na padronização do International Committee of Medical Journal Editors - Vancouver Group. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o PubMed.

Alwarawrah Y, Hughes P, Loisel D, Carlson DA, Darr DB, Jordan JL et al. Fasnall, a Selective FASN Inhibitor, Shows Potent Anti-tumor Activity in the MMTV-Neu Model of HER2(+) Breast Cancer. *Cell Chem Biol*. 2016 Jun 23;23(6):678-88.

Angeles TS, Hudkins RL. Recent advances in targeting the fatty acid biosynthetic pathway using fatty acid synthase inhibitors. *Expert Opin Drug Discov*. 2016 Dec;11(12):1187-1199

Argiris A, Karamouzis MV, Raben D, Ferris RL. Head and neck cancer. *Lancet*. 2008 May 17;371(9625):1695-709.

Bagan J, Sarrion G, Jimenez Y. Oral cancer: clinical features. *Oral Oncol*. 2010 Jun;46(6):414-7.

Bandyopadhyay S, Zhan R, Wang Y, Pai SK, Hirota S, Hosobe S et al. Mechanism of apoptosis induced by the inhibition of fatty acid synthase in breast cancer cells. *Cancer Res*. 2006 Jun 1;66(11):5934-40.

Barac A, Mitulovic G, Hallström S, Zehetmayer S, Grasl MC, Erovic BM. Impact of combined treatment with nimesulide and cisplatin on oral carcinoma cells. *Onco Targets Ther*. 2017 Jul 19;10:3607-3616.

Baron A, Migita T, Tang D, Loda M. Fatty acid synthase: a metabolic oncogene in prostate cancer? *J Cell Biochem*. 2004 Jan 1;91(1):47-53. Review.

Bastos DC, Paupert J, Maillard C, Seguin F, Carvalho MA, Agostini M, et al. Effects of fatty acid synthase inhibitors on lymphatic vessels: an in vitro and in vivo study in a melanoma model. *Lab Invest*. 2017 Feb;97(2):194-206.

Benjamin DI, Li DS, Lowe W, Heuer T, Kemble G, Nomura DK. Diacylglycerol Metabolism and Signaling Is a Driving Force Underlying FASN Inhibitor Sensitivity in Cancer Cells. *ACS Chem Biol*. 2015 Jul 17;10(7):1616-23.

Boot A, van Eendenburg J, Crobach S, Ruano D, Speetjens F, Calame J, et al. Characterization of novel low passage primary and metastatic colorectal cancer cell lines. *Oncotarget*. 2016 Mar 22;7(12):14499-509.

Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018 Nov;68(6):394-424.

Brenner AJ, Falchook G, Patel M, et al. Heavily pre-treated breast cancer patients show promising responses in the first in human study of the first-in-class fatty acid synthase (FASN) inhibitor, TVB-2640 in combination with paclitaxel. San Antonio Breast Cancer Symposium; 2016; Abstract number P6-11-09. December 6-10, 2016; San Antonio, Texas

Brink J, Ludtke SJ, Yang CY, Gu ZW, Wakil SJ, Chiu W. Quaternary structure of human fatty acid synthase by electron cryomicroscopy. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002 Jan 8;99(1):138-43.

Brophy E, Conley J, O'Hearn P, Douglas M, Cheung C. (2013). Pharmacological target validation studies of fatty acid synthase in carcinoma using the potent, selective and orally bioavailable inhibitor IPI-9119. *Cancer Research* 73 (8 Supplement), 1891.

Browne CD, Hindmarsh EJ, Smith JW. Inhibition of endothelial cell proliferation and angiogenesis by orlistat, a fatty acid synthase inhibitor. *FASEB J*. 2006 Oct;20(12):2027-35.

Buckley D, Duke G, Heuer TS, O'Farrell M, Wagman AS, McCulloch W, Kemble G. Fatty acid synthase - Modern tumor cell biology insights into a classical oncology target. *Pharmacol Ther*. 2017 Sep;177:23-31.

Bueno MJ, Colomer R. A Fatty Acid Synthase Inhibitor Shows New Anticancer Mechanisms. *EBioMedicine*. 2015 Aug;2(8):778-779.

Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nature*. 2015 Jan 29;517(7536):576-82.

Cannon RB, Sowder JC, Buchmann LO, Hunt JP, Hitchcock YJ, Lloyd S, et al. Increasing use of nonsurgical therapy in advanced-stage oral cavity cancer: A population-based study. *Head Neck*. 2017 Jan;39(1):82-91.

Carvalho MA, Zecchin KG, Seguin F, Bastos DC, Agostini M, Rangel AL, et al. Fatty acid synthase inhibition with Orlistat promotes apoptosis and reduces cell growth and lymph node metastasis in a mouse melanoma model. *Int J Cancer*. 2008 Dec 1;123(11):2557-65.

Carvalho MA. Estudo das consequências do bloqueio da produção endógena de ácidos graxos sobre a expressão das integrinas e MMPs em modelo murino de melanoma (tese). Piracicaba: Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, 2010.

Catharino RR. Visualizing inhibition of fatty acid synthase through mass spectrometric analysis of mitochondria from melanoma cells. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2011b Feb 15;25(3):449-52.

Chen CC, Lin JC, Chen KW. Lymph node ratio as a prognostic factor in head and neck cancer patients. *Radiat Oncol*. 2015 Aug 25;10:181.

Chi AC, Day TA, Neville BW. Oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma--an update. *CA Cancer J Clin*. 2015 Sep-Oct;65(5):401-21.

Cohen Goldemberg D, de Araújo LHL, Antunes HS, de Melo AC, Santos Thuler LC. Tongue cancer epidemiology in Brazil: incidence, morbidity and mortality. *Head Neck*. 2018 Aug;40(8):1834-1844.

Curado MP, Johnson NW, Kerr AR, Silva DRM, Lanfranchi H, Pereira DL et al. Oral and oropharynx cancer in South America: Incidence, mortality trends and gaps in public databases as presented to the Global Oral Cancer Forum. *Translational Research In Oral Oncology*, [s.l.], v. 1, p.1-7, 3 ago. 2016. SAGE Publications.

Dean EJ, Falchook GS, Patel MR, et al. Preliminary activity in the first in human study of the first-in-class fatty acid synthase (FASN) inhibitor, TVB-2640. *J Clin Oncol*. 2016;34 ((suppl; abstr 2512)). pp.2512

Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer*. 2002 Mar;2(3):161-74. Review.

El Meskini R, Medghalchi S, Vadlamudi A, et al. Fatty acid synthase inhibition for ovarian cancer. *Cancer Res*. 2008;68(9 Supplement):5667.

Flavin R, Peluso S, Nguyen PL, Loda M. Fatty acid synthase as a potential therapeutic target in cancer. *Future Oncol*. 2010 Apr;6(4):551-62.

Funabashi H, Kawaguchi A, Tomoda H, Omura S, Okuda S, Iwasaki S. Binding site of cerulenin in fatty acid synthetase. *J Biochem*. 1989 May;105(5):751-5.

Furuta E, Pai SK, Zhan R, Bandyopadhyay S, Watabe M, Mo YY, et al. Fatty acid synthase gene is up-regulated by hypoxia via activation of Akt and sterol regulatory element binding protein-1. *Cancer Res*. 2008 Feb 15;68(4):1003-11.

Fury MG, Pfister DG. Current recommendations for systemic therapy of recurrent and/or metastatic head and neck squamous cell cancer. *J Natl Compr Canc Netw*. 2011 Jun 1;9(6):681-9. Review.

Gansler TS, Hardman W 3rd, Hunt DA, Schaffel S, Hennigar RA. Increased expression of fatty acid synthase (OA-519) in ovarian neoplasms predicts shorter survival. *Hum Pathol*. 1997 Jun;28(6):686-92.

Gong J, Shen S, Yang Y, Qin S, Huang L, Zhang H, et al. Inhibition of FASN suppresses migration, invasion and growth in hepatoma carcinoma cells by deregulating the HIF-1 α /IGFBP1 pathway. *Int J Oncol*. 2017 Mar;50(3):883-892.

Graner E, Tang D, Rossi S, Baron A, Migita T, Weinstein LJ et al. The isopeptidase USP2a regulates the stability of fatty acid synthase in prostate cancer. *Cancer Cell*. 2004 Mar;5(3):253-61.

Grube S, Dünisch P, Freitag D, Klausnitzer M, Sakr Y, Walter J et al. Overexpression of fatty acid synthase in human gliomas correlates with the WHO tumor grade and inhibition with Orlistat reduces cell viability and triggers apoptosis. *J Neurooncol.* 2014 Jun;118(2):277-287.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011 Mar 4;144(5):646-74.

Hartner L. Chemotherapy for Oral Cancer. *Dent Clin North Am.* 2018 Jan;62(1):87-97.

He H, Li H, Liu D. In Situ Demonstration and Characteristic Analysis of the Protease Using Substrate Immersing Zymography. *Methods Mol Biol.* 2017;1626:205-212.

Heck AM, Yanovski JA, Calis KA. Orlistat, a new lipase inhibitor for the management of obesity. *Pharmacotherapy.* 2000 Mar;20(3):270-9. Review.

Heuer TS, Ventura R, Mordec K, Lai J, Fridlib M, Buckley D, Kemble G. FASN Inhibition and Taxane Treatment Combine to Enhance Anti-tumor Efficacy in Diverse Xenograft Tumor Models through Disruption of Tubulin Palmitoylation and Microtubule Organization and FASN Inhibition-Mediated Effects on Oncogenic Signaling and Gene Expression. *EBioMedicine.* 2017 Feb;16:51-62.

Heussen C, Dowdle EB. Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. *Anal Biochem.* 1980 Feb;102(1):196-202.

Hitomi J, Christofferson DE, Ng A, Yao J, Degterev A, Xavier RJ, Yuan J. Identification of a molecular signaling network that regulates a cellular necrotic cell death pathway. *Cell.* 2008 Dec 26;135(7):1311-23.

Instituto Nacional de Câncer - INCA. Estimativas da incidência e mortalidade por Câncer no Brasil, [acesso 2018 Jan 15]. Disponível em URL: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016>.

Innocenzi D, Alò PL, Balzani A, Sebastiani V, Silipo V, La Torre G, Ricciardi G, Bosman C, Calvieri S. Fatty acid synthase expression in melanoma. *J Cutan Pathol.* 2003 Jan;30(1):23-8.

Jafari N, Drury J, Morris AJ, Onono FO, Stevens PD, Gao T, et al. De Novo Fatty Acid Synthesis-Driven Sphingolipid Metabolism Promotes Metastatic Potential of Colorectal Cancer. *Mol Cancer Res.* 2018 Aug 28.

Jiang B, Li EH, Lu YY, Jiang Q, Cui D, Jing YF, Xia SJ. Inhibition of fatty-acid synthase suppresses P-AKT and induces apoptosis in bladder cancer. *Urology.* 2012 Aug;80(2):484.e9-15.

Jin Q, Yuan LX, Boulbes D, Baek JM, Wang YN, Gomez-Cabello D et al. Fatty acid synthase phosphorylation: a novel therapeutic target in HER2-overexpressing breast cancer cells. *Breast Cancer Res.* 2010;12(6):R96.

Jones SF, Infante JR. Molecular Pathways: Fatty Acid Synthase. *Clin Cancer Res.* 2015 Dec 15;21(24):5434-8.

Kowalski LP, Carvalho AL, Martins Priante AV, Magrin J. Predictive factors for distant metastasis from oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2005 May;41(5):534-41.

Kridel SJ, Axelrod F, Rozenkrantz N, Smith JW. Orlistat is a novel inhibitor of fatty acid synthase with antitumor activity. *Cancer Res.* 2004 Mar 15;64(6):2070-5.

Kridel SJ, Lowther WT, Pemble CW 4th. Fatty acid synthase inhibitors: new directions for oncology. *Expert Opin Investig Drugs.* 2007 Nov;16(11):1817-29. Review.

Krontiras H, Roye GD, Beenken SE, Myers RB, Mayo MS, Peters GE, Grizzle WE. Fatty acid synthase expression is increased in neoplastic lesions of the oral tongue. *Head Neck.* 1999 Jul;21(4):325-9.

Kuemmerle NB, Rysman E, Lombardo PS, Flanagan AJ, Lipe BC, Wells WA et al. Lipoprotein lipase links dietary fat to solid tumor cell proliferation. *Mol Cancer Ther.* 2011 Mar;10(3):427-36.

Kuhajda FP, Piantadosi S, Pasternack GR. Haptoglobin-related protein (Hpr) epitopes in breast cancer as a predictor of recurrence of the disease. *N Engl J Med.* 1989 Sep 7;321(10):636-41.

Kuhajda FP, Jenner K, Wood FD, Hennigar RA, Jacobs LB, Dick JD, Pasternack GR. Fatty acid synthesis: a potential selective target for antineoplastic therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Jul 5;91(14):6379-83.

Kuhajda FP, Pizer ES, Li JN, Mani NS, Frehywot GL, Townsend CA. Synthesis and antitumor activity of an inhibitor of fatty acid synthase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000; 97(7): 3450-4.

Kusakabe T, Nashimoto A, Honma K, Suzuki T. Fatty acid synthase is highly expressed in carcinoma, adenoma and in regenerative epithelium and intestinal metaplasia of the stomach. *Histopathology.* 2002 Jan;40(1):71-9.

Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014 Mar;15(3):178-96. Review.

Li JN, Gorospe M, Chrest FJ, Kumaravel TS, Evans MK, Han WF, et al. Pharmacological inhibition of fatty acid synthase activity produces both cytostatic and cytotoxic effects modulated by p53. *Cancer Res.* 2001 Feb 15;61(4):1493-9.

Lian PL, Liu Z, Yang GY, Zhao R, Zhang ZY, Chen YG, Zhuang ZN, Xu KS. Integrin $\alpha v \beta 6$ and matrix metalloproteinase 9 correlate with survival in gastric cancer. *World J Gastroenterol.* 2016 Apr 14;22(14):3852-9.

Little JL, Wheeler FB, Fels DR, Koumenis C, Kridel SJ. Inhibition of fatty acid synthase induces endoplasmic reticulum stress in tumor cells. *Cancer Res.* 2007 Feb 1;67(3):1262-9.

Liu B, Wang Y, Fillgrove KL, Anderson VE. Triclosan inhibits enoyl-reductase of type I fatty acid synthase in vitro and is cytotoxic to MCF-7 and SKBr-3 breast cancer cells. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2002 Mar;49(3):187-93.

Liu H, Liu Y, Zhang JT. A new mechanism of drug resistance in breast cancer cells: fatty acid synthase overexpression-mediated palmitate overproduction. *Mol Cancer Ther.* 2008 Feb;7(2):263-70.

Loftus TM, Jaworsky DE, Frehywot GL, Townsend CA, Ronnett GV, Lane MD et al. Reduced food intake and body weight in mice treated with fatty acid synthase inhibitors. *Science.* 2000 Jun 30;288(5475):2379-81.

Long XH, Mao JH, Peng AF, Zhou Y, Huang SH, Liu ZL. Tumor suppressive microRNA-424 inhibits osteosarcoma cell migration and invasion via targeting fatty acid synthase. *Exp Ther Med.* 2013 Apr;5(4):1048-1052.

Lu S, Archer MC. Fatty acid synthase is a potential molecular target for the chemoprevention of breast cancer. *Carcinogenesis.* 2005 Jan;26(1):153-7.

Lyons AJ, Jones J. Cell adhesion molecules, the extracellular matrix and oral squamous carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2007 Aug;36(8):671-9.

Maier T, Jenni S, Ban N. Architecture of mammalian fatty acid synthase at 4.5 Å resolution. *Science.* 2006 Mar 3;311(5765):1258-62.

Maier T, Leibundgut M, Boehringer D, Ban N. Structure and function of eukaryotic fatty acid synthases. *Q Rev Biophys.* 2010 Aug;43(3):373-422

Mashima T, Seimiya H, Tsuruo T. *De novo* fatty-acid synthesis and related pathways as molecular targets for cancer therapy. *Br. J. Cancer.* 2009;100(9):1369–1372

McFadden JM, Medghalchi SM, Thupari JN, et al. Application of aflexible synthesis of (5R)-thiolactomycin to develop new inhibitors of type I fatty acid synthase. *J Med Chem.* 2005;48:946–961.

Medes G, Thomas A, Weinhouse S. Metabolism of neoplastic tissue. IV. A study of lipid synthesis in neoplastic tissue slices in vitro. *Cancer Res.* 1953 Jan;13(1):27-9.

Menendez JA, Vellon L, Mehmi I, Oza BP, Ropero S, Colomer R, Lupu R. Inhibition of fatty acid synthase (FAS) suppresses HER2/neu (erbB-2) oncogene overexpression in cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Jul 20;101(29):10715-20.

Menendez JA, Vellon L, Lupu R. Antitumoral action of the anti-obesity drug orlistat (Xenical TM) in breast cancer cells: blockade of cell cycle progression, promotion of apoptotic cell death and PEA-3 mediated transcriptional repression of Her2/neu (erbB-2) oncogene. *Ann Oncol* 2005a; 3 (may).

Menendez JA, Vellon L, Ruth L. Orlistat: From antiobesity drug to anticancer agent in Her-2/neu (erbB2)-overexpressing gastrointestinal tumors? *Society Exp Biol Med* 2005b; 151-154.

Menendez JA, Lupu R. Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis. *Nat Rev Cancer.* 2007 Oct;7(10):763-77. Review.

Menendez JA, Vellon L, Mehmi I, Oza BP, Ropero S, Colomer R et al. Fatty acid synthase: a metabolic enzyme and candidate oncogene in prostate cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2009 Apr 1;101(7):519-32.

Menendez JA, Lupu R. Fatty acid synthase (FASN) as a therapeutic target in breast cancer. *Expert Opin Ther Targets.* 2017 Nov;21(11):1001-1016.

Mishra A, Sriram H, Chandarana P, Tanavde V, Kumar RV, Gopinath A, et al. Decreased expression of cell adhesion genes in cancer stem-like cells isolated from primary oral squamous cell carcinomas. *Tumour Biol.* 2018 May; 40(5): 010428318780859.

Moreira FS. Carcinoma espinocelular oral: Efeitos da associação do Orlistat com Paclitaxel in vitro e em modelo ortotópico e caracterização inicial de enxertos derivados de pacientes (tese). Piracicaba: Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, 2017.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983 Dec 16;65(1-2):55-63.

Moy JD, Moskovitz JM, Ferris RL. Biological mechanisms of immune escape and implications for immunotherapy in head and neck squamous cell carcinoma. *Eur J Cancer*. 2017 May;76:152-166. doi: 10.1016/j.ejca.2016.12.035. Epub 2017 Mar 18. Review.

Murata S, Yanagisawa K, Fukunaga K, Oda T, Kobayashi A, Sasaki R et al. Fatty acid synthase inhibitor cerulenin suppresses liver metastasis of colon cancer in mice. *Cancer Sci*. 2010 Aug;101(8):1861-5.

Neville BW, Damm DD, Allen CM, Chi CC. *Patologia oral e maxilofacial*. 4ª edição Rio de Janeiro: Elsevier; 2016.

O'Farrell M, Crowley R, Heuer T, Buckley D, Rubin o CM, McCu lloch W, et al., Biomarker and PK/PD analyses of first-in-class FASN inhibitor TVB-2640 in a first-in-human phase 1 study in solid tumor patients [abstract]. In: Proceedings of the 106th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research; 2015 Apr 18 – 22; Philadelphia, PA. Philadelphia (PA): AACR; *Cancer Res* 2015;75(15 Suppl):Abstract nr 2675.

Ohol YM, Wang Z, Kemble G, Duke G. Direct Inhibition of Cellular Fatty Acid Synthase Impairs Replication of Respiratory Syncytial Virus and Other Respiratory Viruses. *PLoS One*. 2015 Dec 11;10(12):e0144648.

Omura K. Current status of oral cancer treatment strategies: surgical treatments for oral squamous cell carcinoma. *Int J Clin Oncol*. 2014;19(3):423-30.

Ookhtens M, Kannan R, Lyon I, Baker N. Liver and adipose tissue contributions to newly formed fatty acids in an ascites tumor. *Am J Physiol*. 1984 Jul;247(1 Pt 2):R146-53.

Orita H, Coulter J, Tully E, et al. Inhibiting fatty acid synthase for chemoprevention of chemically induced lung tumors. *Clin Cancer Res*. 2008;14:2458 –2464.

Oslob JD, Johnson RJ, Cai H, Feng SQ, Hu L, Kosaka Y et al. Imidazopyridine-Based Fatty Acid Synthase Inhibitors That Show Anti-HCV Activity and in Vivo Target Modulation. *ACS Med Chem Lett*. 2012 Dec 2;4(1):113-7.

Pascual G, Avgustinova A, Mejetta S, Martín M, Castellanos A, Attolini CS et al. Targeting metastasis-initiating cells through the fatty acid receptor CD36. *Nature*. 2017 Jan 5;541(7635):41-45

Piyathilake CJ, Frost AR, Manne U, Bell WC, Weiss H, Heimburger DC et al. The expression of fatty acid synthase (FASE) is an early event in the development and progression of squamous cell carcinoma of the lung. *Hum Pathol*. 2000 Sep;31(9):1068-73.

Pizer ES, Wood FD, Heine HS, Romantsev FE, Pasternack GR, Kuhajda FP. Inhibition of fatty acid synthesis delays disease progression in a xenograft model of ovarian cancer. *Cancer Res.* 1996 Mar 15;56(6):1189-93.

Pizer ES, Chrest FJ, DiGiuseppe JA, Han WF. Pharmacological inhibitors of mammalian fatty acid synthase suppress DNA replication and induce apoptosis in tumor cell lines. *Cancer Res.* 1998 Oct 15;58(20):4611-5.

Pizer ES, Thupari J, Han WF, Pinn ML, Chrest FJ, Frehywot GL et al. Malonyl-coenzyme-A is a potential mediator of cytotoxicity induced by fatty-acid synthase inhibition in human breast cancer cells and xenografts. *Cancer Res.* 2000 Jan 15;60(2):213-8.

Puram SV, Rocco JW. Molecular Aspects of Head and Neck Cancer Therapy. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2015 Dec;29(6):971-92.

Röhrig F, Schulze A. The multifaceted roles of fatty acid synthesis in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2016 Nov;16(11):732-749.

Rossato FA, Zecchin KG, La Guardia PG, Ortega RM, Alberici LC, Costa RA et al. Fatty acid synthase inhibitors induce apoptosis in non-tumorigenic melan-a cells associated with inhibition of mitochondrial respiration. *PLoS One.* 2014 Jun 25;9(6):e101060.

Rossi S, Graner E, Febbo P, Weinstein L, Bhattacharya N, Onody T, et al. Fatty acid synthase expression defines distinct molecular signatures in prostate cancer. *Mol Cancer Res.* 2003 Aug;1(10):707-15.

Sabine JR, Abraham S, Chaikoff IL. Control of lipid metabolism in hepatomas: insensitivity of rate of fatty acid and cholesterol synthesis by mouse hepatoma BW7756 to fasting and to feedback control. *Cancer Res.* 1967 Apr;27(4):7939.

Sadowski MC, Pouwer RH, Gunter JH, Lubik AA, Quinn RJ, Nelson CC. The fatty acid synthase inhibitor triclosan: repurposing an anti-microbial agent for targeting prostate cancer. *Oncotarget.* 2014 Oct 15;5(19):9362-81.

Salo T, Sutinen M, Hoque Apu E, Sundquist E, Cervigne NK, de Oliveira CE et al. A novel human leiomyoma tissue-derived matrix for cell culture studies. *BMC Cancer.* 2015 Dec 16;15:981.

Santos-Silva AR, Carvalho Andrade MA, Jorge J, Almeida OP, Vargas PA, Lopes MA. Tongue squamous cell carcinoma in young nonsmoking and nondrinking patients: 3 clinical cases of orthodontic interest. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2014 Jan;145(1):103-7.

Schcolnik-Cabrera A, Chávez-Blanco A, Domínguez-Gómez G, Taja-Chayeb L, Morales-Barcenas R, Trejo-Becerril C et al. Orlistat as a FASN inhibitor and multitargeted agent for cancer therapy. *Expert Opin Investig Drugs*. 2018 May;27(5):475-489.

Scully C, Bagan J. Oral squamous cell carcinoma: overview of current understanding of aetiopathogenesis and clinical implications. *Oral Dis*. 2009 Sep;15(6):388-99

Seguin F, Carvalho MA, Bastos DC, Agostini M, Zecchin KG, Alvarez-Flores MP et al. The fatty acid synthase inhibitor orlistat reduces experimental metastases and angiogenesis in B16-F10 melanomas. *Br J Cancer*. 2012 Sep 4;107(6):977-87.

Shaverdashvili K, Wong P, Ma J, Zhang K, Osman I, Bedogni B. MT1-MMP modulates melanoma cell dissemination and metastasis through activation of MMP2 and RAC1. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2014 Mar;27(2):287-96.

Shield KD, Ferlay J, Jemal A, Sankaranarayanan R, Chaturvedi AK, Bray F, Soerjomataram I. The global incidence of lip, oral cavity, and pharyngeal cancers by subsite in 2012. *CA Cancer J Clin*. 2017 Jan;67(1):51-64.

Shurbaji MS, Kuhajda FP, Pasternack GR, Thurmond TS. Expression of oncogenic antigen 519 (OA-519) in prostate cancer is a potential prognostic indicator. *Am J Clin Pathol*. 1992 May;97(5):686-91.

Silva SD, Agostini M, Nishimoto IN, Coletta RD, Alves FA, Lopes MA et al. Expression of fatty acid synthase, ErbB2 and Ki-67 in head and neck squamous cell carcinoma. A clinicopathological study. *Oral Oncol*. 2004 Aug;40(7):688-96.

Silva SD, Cunha IW, Rangel AL, Jorge J, Zecchin KG, Agostini M et al. Differential expression of fatty acid synthase (FAS) and ErbB2 in nonmalignant and malignant oral keratinocytes. *Virchows Arch*. 2008a Jul;453(1):57-67.

Silva SD, Perez DE, Nishimoto IN, Alves FA, Pinto CA, Kowalski LP, Graner E. Fatty acid synthase expression in squamous cell carcinoma of the tongue: clinicopathological findings. *Oral Dis*. 2008b May;14(4):376-82.

Silva SD, Perez DE, Alves FA, Nishimoto IN, Pinto CA, Kowalski LP, Graner E. ErbB2 and fatty acid synthase (FAS) expression in 102 squamous cell carcinomas of the tongue: correlation with clinical outcomes. *Oral Oncol*. 2008c May;44(5):484-90.

Silva SD, Cunha IW, Nishimoto IN, Soares FA, Carraro DM, Kowalski LP, Graner E. Clinicopathological significance of ubiquitin-specific protease 2a (USP2a), fatty acid synthase (FASN), and ErbB2 expression in oral squamous cell carcinomas. *Oral Oncol*. 2009 Oct;45(10):

- Silva SD, Cunha IW, Younes RN, Soares FA, Kowalski LP, Graner E. ErbB receptors and fatty acid synthase expression in aggressive head and neck squamous cell carcinomas. *Oral Dis.* 2010 Nov;16(8):774-80.
- Sinevici N, O'sullivan J. Oral cancer: Deregulated molecular events and their use as biomarkers. *Oral Oncol.* 2016 Oct;61:12-8.
- Sloan P, Gale N, Hunter K, Lingen MW, Nylander K, Reibel J, et al. Malignant surface epithelial tumours. In: El-Naggar AK, Chan JK, Grandis Jennifer R, Takata T, Slootweg PJ, organizadores. *WHO Classif Head Neck Tumours. Fourth.* 2017;109– 11.
- Stoops JK, Wakil SJ. Animal fatty acid synthetase. A novel arrangement of the beta-ketoacyl synthetase sites comprising domains of the two subunits. *J BiolChem.* 1981 May 25;256(10):5128-33.
- Sugino T, Baba K, Hoshi N, Aikawa K, Yamaguchi O, Suzuki T. Overexpression of fatty acid synthase in human urinary bladder cancer and combined expression of the synthase and Ki-67 as a predictor of prognosis of cancer patients. *Med Mol Morphol.* 2011 Sep;44(3):146-50.
- Tajhya RB, Patel RS, Beeton C. Detection of Matrix Metalloproteinases by Zymography. *Methods Mol Biol.* 2017;1579:231-244.
- Takahiro T, Shinichi K, Toshimitsu S. Expression of fatty acid synthase as a prognostic indicator in soft tissue sarcomas. *Clin Cancer Res.* 2003 Jun;9(6):2204-12.
- Tao T, Su Q, Xu S, Deng J, Zhou S, Zhuang Y, Huang Y, He C, He S, Peng M, Hoher B, Yang X. Down-regulation of PKM2 decreases FASN expression in bladder cancer cells through AKT/mTOR/SREBP-1c axis. *J Cell Physiol.* 2019 Mar;234(3):3088-3104.
- Thupari JN, Landree LE, Ronnett GV, Kuhajda FP. C75 increases peripheral energy utilization and fatty acid oxidation in diet-induced obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Jul 9;99(14):9498-502.
- Uddin S, Hussain AR, Ahmed M, Bu R, Ahmed SO, Ajarim D et al. Inhibition of fatty acid synthase suppresses c-Met receptor kinase and induces apoptosis in diffuse large B-cell lymphoma. *Mol Cancer Ther.* 2010 May;9(5):1244-55.
- van Dijk BA, Brands MT, Geurts SM, Merks MA, Roodenburg JL. Trends in oral cavity cancer incidence, mortality, survival and treatment in the Netherlands. *Int J Cancer.* 2016 Aug 1;139(3):574-83.
- Vazquez-Martin A, Colomer R, Brunet J, Lupu R, Menendez JA. Overexpression of fatty acid synthase gene activates HER1/HER2 tyrosine kinase receptors in human breast epithelial cells. *Cell Prolif.* 2008 Feb;41(1):59-85.

Ventura R, Mordec K, Waszczuk J, Wang Z, Lai J, Fridlib M, et al. Inhibition of de novo Palmitate Synthesis by Fatty Acid Synthase Induces Apoptosis in Tumor Cells by Remodeling Cell Membranes, Inhibiting Signaling Pathways, and Reprogramming Gene Expression. *EBioMedicine*. 2015 Jul 2;2(8):808-24.

Vermorken JB, Mesia R, Rivera F, Remenar E, Kawecki A, Rottey S et al. Platinum-based chemotherapy plus cetuximab in head and neck cancer. *N Engl J Med*. 2008 Sep 11;359(11):1116-27.

Visca P, Alò PL, Del Nonno F, Botti C, Trombetta G, Marandino F, et al. Immunohistochemical expression of fatty acid synthase, apoptotic-regulating genes, proliferating factors, and ras protein product in colorectal adenomas, carcinomas, and adjacent nonneoplastic mucosa. *Clin Cancer Res*. 1999 Dec;5(12):4111-8.

Wang WQ, Zhao XY, Wang HY, Liang Y. Increased fatty acid synthase as a potential therapeutic target in multiple myeloma. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2008 Jun;9(6):441-7.

Warnakulasuriya S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncol*. 2009 Apr-May;45(4-5):309-16.

Witkiewicz AK, Nguyen KH, Dasgupta A, Kennedy EP, Yeo CJ, Lisanti MP, Brody JR. Co-expression of fatty acid synthase and caveolin-1 in pancreatic ductal adenocarcinoma: implications for tumor progression and clinical outcome. *Cell Cycle*. 2008 Oct;7(19):3021-5.

Witkowski A, Rangan VS, Randhawa ZI, Amy CM, Smith S. Structural organization of the multifunctional animal fatty-acid synthase. *Eur J Biochem*. 1991 Jun 15;198(3):571-9.

Yang W, Hood BL, Chadwick SL, Liu S, Watkins SC, Luo G et al. Fatty acid synthase is up-regulated during hepatitis C virus infection and regulates hepatitis C virus entry and production. *Hepatology*. 2008 Nov;48(5):1396-403.

Yarrow JC, Perlman ZE, Westwood NJ, Mitchison TJ. A high-throughput cell migration assay using scratch wound healing, a comparison of image-based readout methods. *BMC Biotechnol*. 2004 Sep 9;4:21.

Yorioka CW, Coletta RD, Alves F, Nishimoto IN, Kowalski LP, Graner E. Matrix metalloproteinase-2 and -9 activities correlate with the disease-free survival of oral squamous cell carcinoma patients. *Int J Oncol*. 2002 Jan;20(1):189-94.

Zadra G, Ribeiro CF, Chetta P, Ho Y, Cacciatore S, Gao X, et al. Inhibition of de novo lipogenesis targets androgen receptor signaling in castration-resistant prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019 Jan 8;116(2):631-640.

Zaytseva YY, Rychahou PG, Gulhati P, Elliott VA, Mustain WC, O'Connor K, Morris AJ, et al. Inhibition of fatty acid synthase attenuates CD44-associated signaling and reduces metastasis in colorectal cancer. *Cancer Res.* 2012 Mar 15;72(6):1504-17.

Zaytseva YY, Elliott VA, Rychahou P, Mustain WC, Kim JT, Valentino J, Gao T, O'Connor KL, Neltner JM, Lee EY, Weiss HL, Evers BM. Cancer cell-associated fatty acid synthase activates endothelial cells and promotes angiogenesis in colorectal cancer. *Carcinogenesis.* 2014 Jun;35(6):1341-51.

Zaytseva YY, Rychahou PG, Le AT, Scott TL, Flight RM, Kim JT, et al. Preclinical evaluation of novel fatty acid synthase inhibitors in primary colorectal cancer cells and a patient-derived xenograft model of colorectal cancer. *Oncotarget.* 2018 May 15;9(37):24787-24800.

Zecchin KG, Rossato FA, Raposo HF, Melo DR, Alberici LC et al. Inhibition of fatty acid synthase in melanoma cells activates the intrinsic pathway of apoptosis. *Lab Invest.* 2011a Feb;91(2):232-40.

Zecchin KG, Alberici LC, Riccio MF, Eberlin MN, Vercesi AE, Graner E, Catharino RR. Visualizing inhibition of fatty acid synthase through mass spectrometric analysis of mitochondria from melanoma cells. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2011b Feb 15;25(3):449-52.

Zeng L, Biernacka KM, Holly JM, Jarrett C, Morrison AA, Morgan A, et al. Hyperglycaemia confers resistance to chemotherapy on breast cancer cells: the role of fatty acid synthase. *Endocr Relat Cancer.* 2010 May 18;17(2):539-51.

Zhang Y, Wang C, Mizukami H, Itoh H, Kusama M, Ozawa K, Jinbu Y. Increased expression and activation of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in O-1N: hamster oral squamous cell carcinoma with high potential lymph node metastasis. *J Exp Clin Cancer Res.* 2006 Sep;25(3):417-23.

Zhang YY, Wang DC, Su JZ, Jia LF, Peng X, Yu GY. Clinicopathological characteristics and outcomes of squamous cell carcinoma of the tongue in different age groups. *Head Neck.* 2017 Nov;39(11):2276-2282.

Zheng SS, Gao JG, Liu ZJ, Zhang XH, Wu S, Weng BW, et al. Downregulation of fatty acid synthase complex suppresses cell migration by targeting phosphor-AKT in bladder cancer. *Mol Med Rep.* 2016 Feb;13(2):1845-50.

Zhou L, Jiang S, Fu Q, Smith K, Tu K, Li H, Zhao Y. FASN, ErbB2-mediated glycolysis is required for breast cancer cell migration. *Oncol Rep.* 2016 May;35(5):2715-22.

Zhou W, Han WF, Landree LE, et al. Fatty acid synthase inhibition activates AMP-activated protein kinase in SKOV3 human ovarian cancer cells. *Cancer Res.* 2007;67:2964–2971.

Zhou W, Tu Y, Simpson PJ, Kuhajda FP. Malonyl-CoA decarboxylase inhibition is selectively cytotoxic to human breast cancer cells. *Oncogene.* 2009 Aug 20;28(33):2979-87.

ANEXO 1 – VERIFICAÇÃO DE ORIGINALIDADE E PREVENÇÃO DE PLÁGIO

EFEITOS DO INIBIDOR DA ÁCIDO GRAXO SINTASE TVB-3166 SOBRE LINHAGENS CELULARES DERIVADAS DO CARCINOMA ESPINOCELULAR ORAL

RELATÓRIO DE ORIGINALIDADE			
8%	7%	4%	0%
ÍNDICE DE SEMELHANÇA	FONTES DA INTERNET	PUBLICAÇÕES	DOCUMENTOS DOS ALUNOS
FONTES PRIMÁRIAS			
1	pct.capes.gov.br Fonte da Internet		2%
2	bdtd.ibict.br Fonte da Internet		1%
3	repositorio.unesp.br Fonte da Internet		1%
4	Elias, Silvia Taveira(Guerra, Eliete Neves da Silva). "Avaliação in vitro do potencial antineoplástico de plantas do Cerrado em carcinoma de cabeça e pescoço", RIUnB, 2014. Publicação		<1%
5	www.estomatologia.com.br Fonte da Internet		<1%
6	Velloso, Nathália Vieira(Azevedo, Ricardo Bentes de). "Avaliação da eficácia da terapia fotodinâmica mediada pela alumínio cloro ftalocianina - AIPHCl - lipossomal no tratamento de células derivadas do câncer bucal e sua atuação na regulação da via de		<1%